



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาผลกระทบของชนิดกลุ่มเลือด
ฮีโมโกลบิน และเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส
ในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย

โดย ผศ. ดร. จิราภรณ์ ค้อยทรัพย์

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ
30 พฤศจิกายน 2560

สัญญาเลขที่ TRG5880215

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาผลกระทบของชนิดกลุ่มเลือด
ฮีโมโกลบิน และเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส
ในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย

ผศ. ดร. จิราภรณ์ คัญทรัพย์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : TRG5880215

Project Title : The effect of blood groups, hemoglobin type and heme oxygenase-1
in malaria patients

Investigator : Assistant Professor Dr. Jiraporn Kuesap

E-mail Address : jirajira28@yahoo.com

Project Period : 2 years

Malaria is one of the most important public health problems in tropical areas of the world. Several factors are associated with susceptibility to malaria and disease severity, including innate immunity such as blood group, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 (HO-1) polymorphisms. The aim of the study was to investigate the association of ABO blood group, thalassemia types, and HO-1 polymorphisms in malaria infected blood samples collected from areas along the Thai-Myanmar border. Determination of ABO blood group, thalassemia variants, and HO-1 polymorphisms were performed using agglutination test, low pressure liquid chromatography and polymerase chain reaction, respectively. *Plasmodium vivax* was the major infected malaria species in the study samples. The distribution of ABO blood group in malaria infected samples was found to be similar to that previously reported in healthy subjects, of which blood group O being the most prevalent group. Significant association between blood group A and decreased risk of severe malaria was found. Six thalassemia types (30%) were detected, i.e., hemoglobin E (HbE), β -thalassemia, α -thalassemia 1, α -thalassemia 2, HbE with α -thalassemia 2, and β -thalassemia with α -thalassemia 2. Malaria infected samples with thalassemia showed significantly higher risk to severe malaria. The prevalence of HO-1 polymorphisms, S/S, S/L and L/L were 25, 62 and 13%, respectively. Further study with larger sample size is required to confirm the impact of these three host genetic factors in malaria patients.

Keywords : malaria, ABO blood group, thalassemia, heme oxygenase

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880215

ชื่อโครงการ: การศึกษาผลกระทบของชนิดกลุ่มเลือด ฮีโมโกลบิน และเอนไซม์

ฮีมออกซิจีเนส ในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร. จิราภรณ์ คุ้ยทรัพย์

E-mail Address : jirajira28@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่ก่อปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศในเขตร้อนชื้นของโลก ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคมาลาเรียมีหลายอย่าง เช่น ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ได้แก่ หมู่เลือดเอบีโอ ฮีโมโกลบินผิดปกติ และความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและความสัมพันธ์ของหมู่เลือดเอบีโอ ธาลัสซีเมีย และความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่อาศัยอยู่บริเวณชายแดนไทย โดยตรวจหาหมู่เลือดเอบีโอ ธาลัสซีเมีย และความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ด้วยวิธีการทดสอบ ปฏิกริยาการจับกลุ่ม การใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติโครมาโตกราฟีความดันต่ำ และปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าในประชากรผู้ป่วยมาลาเรียที่ศึกษา ส่วนใหญ่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ สำหรับการกระจายตัวของหมู่เลือดเอบีโอในผู้ป่วยโรคมาลาเรียพบที่มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในคนที่มีสุขภาพดี โดยพบความชุกของหมู่เลือดโอมากที่สุด ในขณะที่หมู่เลือดเอ มีความสำคัญในการป้องกันผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรียอย่างรุนแรงได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนความชุกของธาลัสซีเมียคิดเป็นร้อยละสามสิบ และพบหกชนิดด้วยกัน คือ ฮีโมโกลบินอี เบต้าธาลัสซีเมีย แอลฟาธาลัสซีเสีย-1 แอลฟาธาลัสซีเสีย-2 ฮีโมโกลบินอีร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเสีย-2 และเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเสีย-2 โดยพบว่าผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะธาลัสซีเมียมีความเสี่ยงต่อโรคมาลาเรียที่รุนแรงมากกว่าผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีภาวะธาลัสซีเมียอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการศึกษาความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 พบว่าสามารถแบ่งความยาวของยีนตามการซ้ำกันของเบสจีและที่ได้เป็นสามชนิดคือ สั้น/สั้น สั้น/ยาว และยาว/ยาว โดยมีความถี่ร้อยละ 25 62 และ 13 ตามลำดับ แต่ไม่พบมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 กับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย ซึ่งอาจเป็นเพราะขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีไม่มากหรืออาจเป็นเพราะชนิดของเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่ที่ก่อโรคแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ การศึกษาวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ป่วยมาลาเรีย ได้แก่ หมู่เลือดเอบีโอ และภาวะธาลัสซีเมียมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้นเพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามชนิดนี้ในผู้ป่วยมาลาเรีย

คำสำคัญ: มาลาเรีย หมู่เลือดเอบีโอ ธาลัสซีเมีย ฮีมออกซิจีเนส

Executive summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มาลาเรียเป็นโรคเขตร้อนที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจและสังคม ในหลายประเทศทั่วโลก โดยเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในคนมี 5 ชนิดคือ มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) มาลาเรียชนิดไวแวกซ์ (*P. vivax*) มาลาเรียชนิดโอวาล์ (*P. ovale*) มาลาเรียชนิดมาลาเรีย (*P. malariae*) และมาลาเรียชนิดโนเวลล์ (*P. knowlesi*) สำหรับประเทศไทยโรคมาลาเรียยังคงคุกคามชีวิตของประชากรและความเจริญก้าวหน้าทางเศรษฐกิจของประเทศ โดยเฉพาะในบริเวณจังหวัดชายแดนไทยพม่า ชายแดนไทยมาเลเซียและชายแดนไทยกัมพูชา จังหวัดที่มักพบผู้ป่วยมาลาเรียมากได้แก่ ตาก กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน ระนอง สุราษฎร์ธานี ยะลา ชุมพร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ และจันทบุรี ถึงแม้ว่าปัจจุบันนี้จะมีการควบคุมโรคจนประสบความสำเร็จในระดับหนึ่งแล้วก็ตาม แต่ปัญหาการดื้อยาของเชื้อและความล้มเหลวในการรักษายังส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของประชากร โดยเกิดได้จากปัจจัยหลายๆ อย่าง รวมทั้งปัจจัยที่มาจากผู้ป่วยเอง เช่น ความหลากหลายทางพันธุกรรม ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย ภาวะของเม็ดเลือดแดง รวมทั้งเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อหรือเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรีย ซึ่งส่งผลให้ความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยแต่ละคนมีความแตกต่างกัน การศึกษาความสัมพันธ์ของหมู่เลือดเอบีโอกับมาลาเรียพบว่าชนิดของหมู่เลือดมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคมาลาเรียและแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ โดยหมู่เลือดโอช่วยป้องกันการเกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง ขณะที่หมู่เลือดเอและบีเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง ส่วนภาวะทางพันธุกรรมของผู้ป่วยที่อาจส่งผลกระทบต่อความรุนแรงและการรักษาโรคมาลาเรีย เช่น ภาวะเลือดจางชนิดธาลัสซีเมีย นั้น มักพบได้บ่อยในพื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรีย โดยผู้ป่วยมาลาเรียที่มีธาลัสซีเมียจะมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดความรุนแรงของโรคได้ เพราะเม็ดเลือดแดงมีสภาวะไม่เหมาะสม แต่ก็อาจส่งผลกระทบต่อความไวของยาอาร์ติมิซินินซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมาลาเรียในประเทศไทย สำหรับเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส-1 (heme oxygenase-1: HO-1) ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการย่อยสลายฮีโม ไบลิเวอร์ดิน (biliverdin) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นบิลิรูบิน (bilirubin) ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และเหล็ก (iron) เอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส-1 จึงช่วยป้องกันเซลล์จากอันตรายต่างๆ ที่มาจากฮีโมสเตรนในผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebrum malaria) อย่างไรก็ตามความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีโมออกซิจีเนส-1 อาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันได้โดยเฉพาะผู้ป่วยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากมีจำนวนชุดของ (GT)_n ที่โปรโมเตอร์ของยีนน้อย ซึ่งเกี่ยวข้องกับระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีระดับของคาร์บอนมอนอกไซด์ เหล็ก และบิลิรูบินเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โดยระดับคาร์บอนมอนอกไซด์ที่มากเกินไปก็จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ส่วนเหล็กก็จะเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของเชื้อมาลาเรีย โดยพบว่าเชื้อมาลาเรียมีการสร้างสารพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) เพื่อไปกระตุ้นระดับของเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส-1 ได้นอกจากนี้การระบาดของโรคมาลาเรียบริเวณแนวชายแดนระหว่างประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านอาจมีความชุกเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการเข้าร่วมประชาคมเศรษฐกิจอาเซียนในปี 2558 ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนย้ายแรงงานบริเวณชายแดนมีความสะดวกมากขึ้น และส่งผลต่อการระบาดของโรคมาลาเรีย จึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและติดตามการระบาดของโรคมาลาเรีย รวมทั้งการศึกษาความชุกของภาวะทางพันธุกรรมและความหลากหลายของยีนดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการใช้ยารักษาโรคมาลาเรียได้

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษานิตของหมู่เลือดเอบีโอที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ระบาดของประเทศไทย

2.2 เพื่อศึกษาความชุกของธาลัสซีเมียของผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ระบาดของประเทศไทย

2.3 เพื่อศึกษาความหลากหลายของจำนวนชุดของ (GT)n ของยีนฮีมออกซิเจนเนส-1 ในผู้ป่วย

มาลาเรีย และ ความสัมพันธ์ของเอนไซม์กับความรุนแรงของโรคมมาลาเรีย

2.4 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของธาลัสซีเมียและยีนฮีมออกซิเจนเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ประชากรศึกษาและเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์ ที่เข้ารับการรักษาในสถานพยาบาลของรัฐ จำนวน 100 ราย โดยเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำปริมาตร 5 มิลลิตรเพียงครั้งเดียวก่อนผู้ป่วยจะได้รับยาในการรักษา นำเลือดไปเตรียมไลต์แบบหนาและบางแล้วย้อมด้วยสีย้อมชาเพื่อตรวจหาและนับจำนวนเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งปริมาณเชื้อในกระแสเลือดที่มากกว่า 100,000 ตัวต่อไมโครลิตรสามารถจำแนกเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือดในปริมาณที่สูง (hyperparasitemia) และจัดเป็นการติดเชื้อชนิดรุนแรง (severe malaria) จากนั้นทำการหาชนิดหมู่เลือดเอบีโอของผู้ป่วยด้วยวิธีการตกตะกอน (agglutination test) สำหรับการหาชนิดของธาลัสซีเมีย ทำการส่งตรวจที่โรงพยาบาลในพื้นที่กรณีโรงพยาบาลในพื้นที่ไม่มีเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์จึงส่งตรวจที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ส่วนความชุกและรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีมออกซิเจนเนส-1 ของผู้ป่วยมาลาเรียจะวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

3.2 การตรวจวิเคราะห์ภาวะธาลัสซีเมีย

การตรวจกรองภาวะธาลัสซีเมียโดยการวัดความเปราะของเม็ดเลือดแดง โดยดูการแตกของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.36% ซึ่งเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะแตกหมด แต่เม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย และ ฮีโมโกลบิน อี จะแตกไม่หมด อย่างไรก็ตามผู้ที่เป้นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 ฮีโมโกลบิน อี และ Hb CS จะให้ผลเหมือนคนปกติ การตรวจกรองจะต้องทำควบคู่กับการทดสอบยืนยัน หรือแยกชนิดด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำควบคู่กับการตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดงและการตรวจชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี LPLC การตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดง (red cell indices) เป็นการวัดปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (mean cell volume: MCV) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจนับเม็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ (complete blood count: CBC) จะช่วยการวินิจฉัยธาลัสซีเมีย โดยคนปกติจะมีค่า 85-95 เฟมโตลิตร (fL) ผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ 2 จะมีค่า $70 + 8.7$ fL และ $85 + 5.5$ fL ตามลำดับ ในขณะที่ผู้ที่เป้นพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียและเบต้าธาลัสซีเมียจะมีค่า $68 + 6.9$ fL และ $55 + 6.5$ fL ตามลำดับ ส่วนผู้ที่เป้นพาหะของฮีโมโกลบิน อี จะมีค่า $84 + 5.1$ fL ส่วนการตรวจวิเคราะห์ชนิดของธาลัสซีเมียจะนำตัวอย่างเลือดครบส่วนมาตรวจแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเพื่อหาชนิดของธาลัสซีเมีย ตามหลักการการตรวจแยกชนิดและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินด้วยวิธี low pressure liquid chromatography (LPLC) (automated analyzer: Hb Gold) หากตัวอย่างเลือดมีผลการตรวจว่าไม่เป็นพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบิน อี แต่มีค่า MCV ต่ำ จะทำการตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด

Southeast Asia (SEA) และ Thai (THAI) และตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดที่มีการขาดหายไปของยีน - 3.7 kb และ -4.2 kb และชนิด non deletion Hb CS และ Hb PS

3.3 อีเอ็มออกซิจีเนส -1

ศึกษารูปแบบความหลากหลายของยีนอีเอ็มออกซิจีเนส-1 โดยสกัดดีเอ็นเอจากชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนโปรโมเตอร์ด้วยวิธี PCR เพื่อพิจารณาขนาดของยีนโดยการเรียงตัวซ้ำๆกันของจำนวนชุดของ (GT)_n และแบ่งเป็นแบบสั้นและแบบยาว แล้วนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของจำนวนชุดของ (GT)_n ของยีนอีเอ็มออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรียกับความรุนแรงของโรคมาลาเรียโดยพิจารณาความรุนแรงจากจำนวนเชื้อในกระแสเลือด

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS โดยความถี่ของชนิดมาลาเรีย หมู่เลือดเอบีโอ ชนิดธาลัสซีเมีย ความชุกและรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนอีเอ็มออกซิจีเนส-1 ที่พบในผู้ป่วยมาลาเรีย จะแสดงผลเป็นร้อยละ การศึกษาความสัมพันธ์ของหมู่เลือดเอบีโอกับการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวกัวกซ์ ธาลัสซีเมียกับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย (จำนวนเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด) ความหลากหลายของจำนวนชุดของ (GT)_n ของยีนอีเอ็มออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรียกับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย รวมทั้งความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของธาลัสซีเมียกับยีนอีเอ็มออกซิจีเนส-1 ที่พบในผู้ป่วยมาลาเรีย จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Chi-square ที่ $\alpha = 0.05$

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

แผนการดำเนินงาน	ระยะเวลา			
	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	1-6	7-12	1-6	7-12
เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรีย	←		→	
ตรวจสอบชนิดหมู่เลือดเอบีโอ	←		→	
วิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบิน (ธาลัสซีเมีย)	←		→	
สกัดดีเอ็นเอ		←	→	
วิเคราะห์ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาด้วยวิธีพีซีอาร์			←	→
วิเคราะห์ยีนอีเอ็มออกซิจีเนสด้วยวิธีพีซีอาร์			←	→
วิเคราะห์ผลและเขียนรายงานรวมทั้งตีพิมพ์ผลงาน				←

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: The effect of blood groups, hemoglobin type and heme oxygenase-1 in malaria patients in endemic areas of Thailand

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Malaria Journal

ค่า impact factor: 3.49

6. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน โดยงบประมาณไม่เกิน 300,000 บาท/ปี)

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ (13,000x12)	156,000.00	156,000.00	312,000.00
- ค่าตอบแทนอาสาสมัคร (100 คน x 500 บาท)	25,000.00	25,000.00	50,000.00
2. หมวดค่าวัสดุ			
- ค่าน้ำยาทดสอบ HO-1 ELISA kits, ชุดสกัดดีเอ็นเอ, ชุดตรวจหมู่เลือด, สาร dNTPs, Taq polymerase, HO-1 primers, thalassemia primers, DNase and RNase free water, restriction enzyme, acrylamide, DNA marker เป็นต้น	95,500.00	95,500.00	191,000.00
- เข็มเจาะเลือด, ไซริงค์, หลอดบรรจุสารกันเลือดแข็ง, microcentrifuge tube, pipette tips, PCR tube, glass slide, slide box, ELISA plate เป็นต้น	3,000.00	3,000.00	6,000.00
- ค่าวัสดุสิ้นเปลืองและค่าวัสดุสำนักงาน	500.00	500.00	1,000.00
3. หมวดใช้สอย			
- ค่าวิเคราะห์ธาลัสซีเมียทางห้องปฏิบัติการ (100x400)	20,000.00	20,000.00	40,000
4. หมวดค่าจ้าง	0	0	0
งบประมาณโครงการ	300,000.00	300,000.00	600,000.00

การศึกษาผลกระทบของชนิดกลุ่มเลือด ฮีโมโกลบิน และเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส ในผู้ป่วยโรค
มาลาเรีย

The effect of blood groups, hemoglobin type and heme oxygenase-1 in malaria patients

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของหมู่เลือดเอบีโอที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ระบาดของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความชุกของธาลัสซีเมียของผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ระบาดของประเทศไทย
3. เพื่อศึกษาความหลากหลายของจำนวนชุดของ (GT)n ของยีนฮีโมออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย

และความสัมพันธ์ของเอนไซม์กับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของธาลัสซีเมียและยีนฮีโมออกซิ-

จีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย

บทที่ 1

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเจ็บป่วยและเป็นสาเหตุการตายของคนตั้งแต่ยุคอดีตจนถึงปัจจุบัน การติดเชื้อมาลาเรียก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบแอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งรวมประเทศไทยด้วย โดยมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องและมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค เช่น ระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (Stevenson and Riley 2004) ฮีโมโกลบินผิดปกติ (Weatherall 1997) และเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส (Takeda et al. 2005, Kuesap et al. 2010) ทั้งนี้ความแตกต่างทางภูมิศาสตร์และประชากรมีความเกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งส่งผลในการป้องกันโรคมาลาเรียต่างกันด้วย (Campino et al. 2006) รายงานความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างหมู่เลือดเอบีโอและโรคมาลาเรียในบางพื้นที่ แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัมแบบรุนแรงพบในหมู่เลือดต่างกัน ในประชากรแต่ละพื้นที่ เช่นพบการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัมแบบรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเอ ในชาวกิบบอน (Lell et al., 1999), เติร์กเมนิสถาน (Tekeste and Petros, 2010) และซิมบับเว (Fischer and Boone, 1998) พบในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเอบี ชาวศรีลังกา (Pathirana et al., 2005), มาลี (Rowe et al., 2007) และเติร์กเมนิสถาน (Tekeste and Petros, 2010) และพบในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดบี ชาวอินเดีย (Panda et al., 2011) ในขณะที่ผู้ป่วยมาลาเรียที่มีหมู่เลือดโอมีรายงานว่าสามารถป้องกันการเกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมองได้ (Rout et al. 2012) สำหรับภาวะธาลัสซีเมียซึ่งเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการสร้างสายโกลบิน พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียได้ โดยภาวะธาลัสซีเมียนั้นจะพบได้ทั่วไปในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย (Vento et al. 2006) โดยการป้องกันมาลาเรียนั้นมีรายงานว่าพบในผู้ป่วยที่มีภาวะธาลัสซีเมียแบบ hemoglobin E (Chotivanich et al. 2002) α -thalassemia (Weatherall 1997, Wambua et al. 2006) และ β -thalassemia (Pasvol et al. 1976, Pantaleo et al. 2012) ส่วนความสัมพันธ์ของเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส 1 และมาลาเรียมีรายงานในประชากรบางกลุ่ม โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส 1 เกี่ยวข้องกับการเกิดมาลาเรียชนิดรุนแรงในผู้ป่วยเด็กชาวแอฟริกัน (Walther et al. 2012) และการเกิดมาลาเรียขึ้นสมองในผู้ป่วยชาวมาลาเวีย (Clark et al. 2003), ผู้ป่วยเด็กชาวแองโกลาน (Sambo et al. 2010) และชาวพม่า (Takeda et al. 2005) เอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส-1 นั้นเป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นได้จากสิ่งเร้า (inducible enzyme) ทำให้เกิดการสลายฮีโมซึ่งส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบิน ได้ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิด คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO), บิลิเวอร์ดีน และเหล็ก (Tenhunen et al. 1968, Shibahara et al. 2002, Shibahara 2003) ดังนั้นเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส 1 จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อเชื้อมาลาเรียในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเนื่องจากเชื้อมาลาเรียต้องการเหล็กจากการสลายฮีโมเพราะเชื้อมาลาเรียไม่มีเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส 1 จึงไม่สามารถสลายฮีโมเพราะปลดปล่อยเหล็กได้เอง ในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะธาลัสซีเมียร่วมด้วย โดยเฉพาะชนิดฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ซึ่งพบมากในประชากรชาวไทย (Fucharoen and Winichagoon 2002, Chotivanich et al. 2002) เม็ดเลือดแดงจะมีคุณสมบัติ

แตกต่างจากเม็ดเลือดแดงปกติ ซึ่งส่งผลกับปริมาณเหล็กที่มัลลาเรียจะนำไปใช้ได้ (Nagel et al. 1981) ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์หมู่เลือด ธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลิน 1 ในผู้ป่วยมัลลาเรียจึงเป็นที่น่าสนใจ การศึกษานี้จึงจัดตั้งขึ้นมาเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะดังกล่าวในผู้ป่วยมัลลาเรียที่อาศัยในประเทศไทย

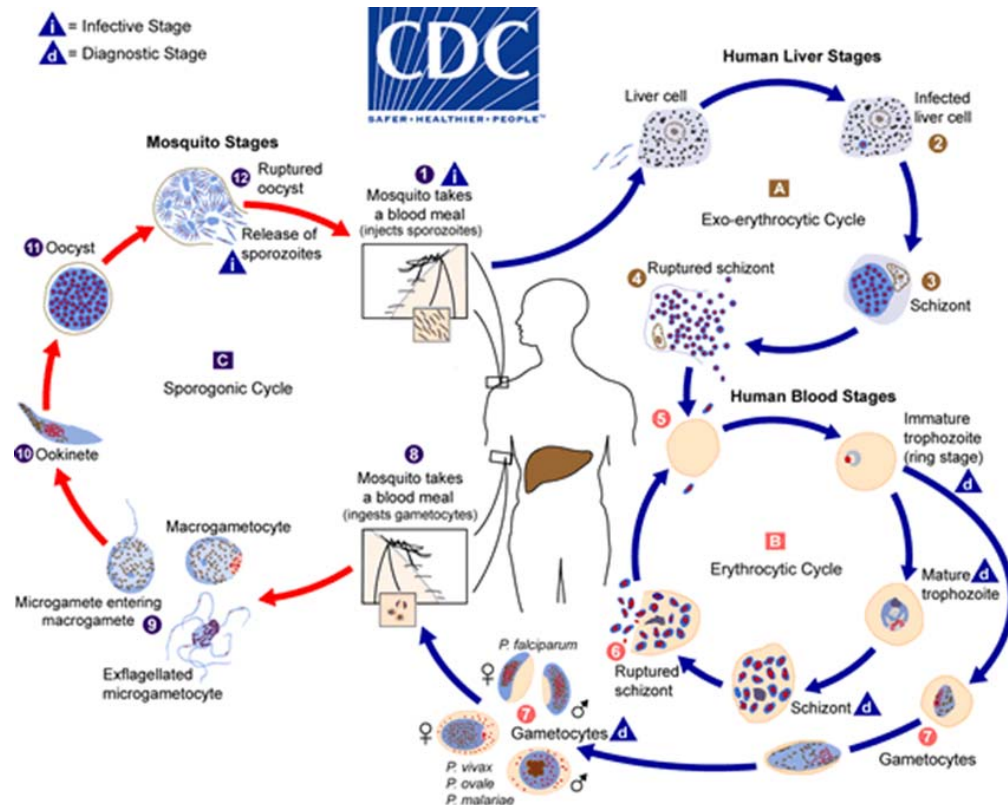
บทที่ 2

บททวนเอกสารและวรรณกรรม

1. มาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยซึ่งพบปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยาที่ใช้ในการรักษาสูง จึงส่งผลกระทบต่อ การพัฒนาประเทศทั้งด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจและสังคมของชาติ มาลาเรียเป็นโรคเขตร้อนที่ ถูกจัดให้เป็นเป้าหมายในการควบคุมขององค์การอนามัยโลก เพราะในแต่ละปี มีประชากรกว่า 350 ถึง 500 ล้านคน ติดเชื้อมาลาเรียและมีผู้เสียชีวิตประมาณ 1.5 ล้านคน (WHO 2001) มาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ที่มีอยู่เป็นพาหะนำโรค โดย เชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในคนมี 5 ชนิด ประกอบด้วย มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) มาลาเรียชนิดไวแวกซ์ (*P. vivax*) มาลาเรียชนิดโอวาล์ (*P. ovale*) มาลาเรียชนิดมาลาเรียอี (*P. malariae*) และมาลาเรียชนิดโนเวลลี (*P. knowlesi*) โดยเชื้อที่ก่อ โรคในประชากรส่วนใหญ่คือเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ทั้งนี้เชื้อ ที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพรุนแรงและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตคือมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ส่วน เชื้อที่มีการแพร่กระจายในหลายพื้นที่และเกิดการติดเชื้อซ้ำแบบ relapse และนำไปสู่ความ รุนแรงจากภาวะม้ามโตคือมาลาเรียชนิดไวแวกซ์

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียต้องการโฮสต์ (host) 2 ชนิด คือ คน และยุงก้นปล่องเพศเมีย (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นพาหะนำโรค การแพร่ของเชื้อมาลาเรียสู่คนเกิดจากยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อ มาลาเรียกัดคนและปล่อยเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด มาลาเรียจึงเป็นโรคติดต่อที่เกิดปัญหา ทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจในประเทศกำลังพัฒนา โดยก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่ แตกต่างกันไป ได้ทั้งที่ไม่มีอาการ หรือมีอาการทั่วไปคล้ายหวัด ไปจนถึงภาวะโรคที่มีความ รุนแรง เช่น ภาวะมาลาเรียขึ้นสมองซึ่งเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงที่สำคัญเนื่องจากการติดเชื้อ มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ทำให้เกิดอาการโคม่าและอาจทำให้เสียชีวิตได้ (Newton and Krishna 1998) ในประเทศไทยนั้น พื้นที่ระบาดของมาลาเรียจะพบบริเวณป่า เขา ซึ่งเป็นแหล่งที่มียุง พาหะอาศัยอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณชายแดนที่มีอาณาเขตติดต่อกับเพื่อนบ้าน เช่นอาณา เขตติดต่อกับประเทศพม่า มาเลเซีย และกัมพูชา ในปี พ.ศ. 2556 อัตราส่วนเชื้อก่อโรคที่พบคือ มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ร้อยละ 40 และมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ร้อยละ 60 (60%) และมียุง พาหะหลักคือ *anopheles species*, *An. dirus*, *An. minimus*, *An. maculatus*, *An. sundanicus* (WHO 2013) ถึงแม้ว่าอุบัติการณ์การเกิดโรคและอัตราการตายเนื่องจากมาลาเรียในประเทศไทยจะลดลง แต่มาลาเรียก็ยังก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขในพื้นที่ชายแดนของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูฝน (Nacher et al. 2004) ซึ่งสภาวะเหมาะสมกับยุงพาหะ โดย ปัญหาหลักในการกำจัดมาลาเรียในประเทศไทยมี 3 ข้อ คือ (1) การระบาดของเชื้อมาลาเรีย ชนิดฟัลซิพารัมที่ดื้อยาอย่างรวดเร็ว (2) พฤติกรรมของยุงพาหะ (3) การเคลื่อนย้ายของ ประชากรในการประกอบอาชีพ (Kamolratanakul et al. 1994)



รูปที่ 1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

(<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> วันที่ 30 พฤศจิกายน 2560)

2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของมาลาเรีย

พยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคมาลาเรียขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่เกิดจากเชื้อมาลาเรีย ปัจจัยที่เกิดจากคน และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม โดยพบว่ามีปัจจัยหลายประการที่แสดงถึงความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย เช่น ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (Stevenson and Riley 2004)) ฮีโมโกลบินผิดปกติ เช่น ธาลัสซีเมีย (Weatherall 1997), ความผิดปกติของเอนไซม์ เช่น glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency (Guindo et al. 2007) ฮีโมออกซีจีเนส (HO) (Takeda et al. 2005, Kuesap et al. 2010) tumor necrosis factor- α promoter polymorphism (TNF- α) (Grau et al. 1989) และความหลากหลายของเม็ดเลือดแดง (Genton et al. 1995, Weatherall et al. 2002)

2.1 หมู่เลือดเอบีโอ

หมู่เลือดเอบีโอ เป็นหมู่เลือดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในคนทุกคนซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของยีน (gene) ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน (antigen) บนผิวเม็ดเลือดแดงที่ได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยยีนดังกล่าวอยู่บนโครโมโซมที่ 9 ตำแหน่ง 9q34.1-q34.2 ประกอบด้วย 7 exons ความยาวมากกว่า 18 กิโลเบส โดยส่วนที่ใหญ่ที่สุดคือ Exon 7 ซึ่งมี coding sequence อยู่ในขณะ Exon 6 มีส่วนที่ขาดหายไปซึ่งแสดงออกเป็นหมู่เลือดโอ และการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลง ในคนที่มีหมู่เลือดเอ จะมีแอนติเจนเอ อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดง

คนที่มีหมู่เลือดบีจะมีแอนติเจนบีอยู่ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง ส่วนคนที่มีหมู่เลือดเอบีจะมีทั้งแอนติเจนทั้งเอและบีอยู่บนเม็ดเลือดแดง ในขณะที่คนที่มีหมู่เลือดโอจะไม่มีทั้งแอนติเจนเอและบีบนผิวเม็ดเลือดแดง ในปัจจุบันไม่มีโรคที่พบว่าเกิดจากการที่ไม่มีการแสดงออกของแอนติเจนของหมู่เลือดเอบีโอ แต่มีการศึกษาความไวต่อการเกิดโรคกับหมู่เลือดเอบีโอ และพบความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารในคนที่มีหมู่เลือดเอ (Reid and Bird 1990) ในขณะที่พบความสัมพันธ์ของการมีแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นในคนที่มีหมู่เลือดโอ (O'Donnell and Laffan 2001)

ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคมalariaเรื้อรังและยีนของผู้ป่วย เช่น หมู่เลือดเอบีโอ ได้มีการศึกษาในบางพื้นที่ ได้แก่ การศึกษาในภูมิภาคตะวันตกเฉียงเหนือของเอธิโอเปีย (Tadesse 2013) พบว่าประชากรมีหมู่เลือดโอมากที่สุด ในขณะที่หมู่เลือดที่พบผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงสูงสุดคือหมู่เลือด เอ และ บี แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีหมู่เลือด เอ, บี และ เอบี มีความไวต่อการเกิดมาลาเรียชนิดรุนแรงมากกว่าผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดโอ (Tadesse 2013) เช่นเดียวกันกับการศึกษาในประเทศอินเดียซึ่งพบผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมมีหมู่เลือดบี สูง ขณะที่หมู่เลือด โอ ป้องกันการเกิดมาลาเรียขึ้นสมองอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นผู้ป่วยมาลาเรียที่มีหมู่เลือด เอ และ บี จึงมีความเสี่ยงสูงในการพัฒนาเป็นมาลาเรียขึ้นสมอง (Rout et al. 2012) นอกจากนี้ในหลายการศึกษาได้สนับสนุนว่าผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดโอ มีโอกาสพัฒนาเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงได้น้อย (Deepa et al., 2011; Panda et al., 2011; Wolofsky et al., 2012) แม้ว่าหมู่เลือดโอจะมีการกระจายสูงสุดในหมู่เลือดเอบีโอในพื้นที่ระบาดของมาลาเรียทั่วโลก จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าหมู่เลือดโอและเชื้อมาลาเรียมีความเชื่อมโยงกันในประวัติศาสตร์การวิวัฒนาการ (Cserti and Dzik, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของมาลาเรียกับหมู่เลือดเอบีโอ โดยพบการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมแบบรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเอ ในชาวกิบบอน (Lell et al., 1999), เอธิโอเปีย (Tekeste and Petros, 2010) และซิมบับเว (Fischer and Boone, 1998) พบในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเอบี ชาวศรีลังกา (Pathirana et al., 2005), มาลี (Rowe et al., 2007) และเอธิโอเปีย (Tekeste and Petros, 2010) และพบในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดบี ชาวอินเดีย (Panda et al., 2011) ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวในผู้ป่วยชาวไทยจึงน่าสนใจอย่างยิ่ง

2.2 ธาลัสซีเมีย

ธาลัสซีเมีย หรือภาวะความผิดปกติของฮีโมโกลบิน ซึ่งเกิดจากการสร้างฮีโมโกลบิน ฮีโมโกลบินประกอบด้วยสาย α -globin 2 สาย และ β -globin 2 สาย ธาลัสซีเมียจึงแบ่งได้ตามสายโกลบินได้ 2 ชนิดคือ α - และเบต้าธาลัสซีเมีย (β -thalassemia) ตามความผิดปกติของสายโกลบิน โดย แอลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia) เกิดจากการความบกพร่องในการสร้างสาย α -globin บนโครโมโซม 16p13.3 (Yuthavong et al. 1993) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากยีนปกติไปเป็น แอลฟาธาลัสซีเมีย -1 (α -thalassemia-1) ซึ่งมีความรุนแรงมาก และ แอลฟาธาลัสซีเมีย -2 (α -thalassemia-2) ซึ่งมีความรุนแรงน้อย ส่วนเบต้าธาลัสซีเมีย กิดจากการความบกพร่องในการสร้างสาย β -globin บนโครโมโซม 11p15.5 (Yuthavong and Wilairat 1993)

ซึ่งมักเกิดจากการกลายพันธุ์มากกว่าการ deletion ธาลัสซีเมีย ชนิด Hemoglobin E (Hb E) พบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Fucharoen and Winichagoon 1987) เกิดจากการ glutamic acid ที่ codon 26 ของสาย β -globin ด้วย lysine (Ohashi et al. 2004) ธาลัสซีเมียนั้นพบกระจายทั่วโลกโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรีย (Vento et al. 2006) ซึ่งภาวะร่วมกันดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการป้องกันโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุจากเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมในหลายพื้นที่ (Wambua et al. 2006, Mockenhaupt et al. 2001, Yuthavong and Wilairat 1993) ทั้งนี้การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม จึงควรมีการศึกษาในเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ซึ่งเป็นเชื้อที่พบมากอีกชนิดหนึ่งด้วย

2.3 ฮีมออกซิจีเนส-1

เอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 อาจมีบทบาทสำคัญในโรคมาลาเรีย (Shibahara, 2003) โดยฮีมออกซิจีเนส 1 เป็น microsomal enzyme ซึ่งมี 2 isoforms คือ HO-1 และ HO-2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสลายฮีม (heme degradation process) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิดคือ คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO), บิลิเวอร์ดิน และเหล็ก (Tenhunen et al. 1968, Shibahara et al. 2002, Shibahara 2003) ในส่วนโปรโมเตอร์ของยีนฮีมออกซิจีเนส 1 มีเบส GT ที่ซ้ำกันโดยมีความหลากหลายในแต่ละบุคคล และมีการกลายพันธุ์ของ single nucleotide polymorphisms (SNPs) 2 ตำแหน่งคือ G(-1135)A และ T(-413) ซึ่งทั้งความหลากหลายของ (GT)_n repeat และ SNPs มีความเกี่ยวข้องกับการ transcription ทั้งนี้พบว่า Long (GT)_n alleles เกี่ยวข้องกับมาลาเรียโดยต้านการเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง ฉะนั้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส 1 อาจเป็นเป้าหมายหนึ่งในการรักษามาลาเรียในอนาคต ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส 1 และมาลาเรียจากการศึกษาใน in vitro และระบาดวิทยาทางโมเลกุล (Schluesener et al. 2001, Clark et al. 2003, Takeda et al. 2005, Yeo et al. 2013) การศึกษาความหลากหลายของ (GT)_n repeat ของยีนฮีมออกซิจีเนส 1 มีรายงานในผู้ป่วยเชื้อซาดิกะเหยิง (Takeda et al., 2005) และในผู้ป่วยชาวไทยและพม่า ที่อาศัยในบริเวณพื้นที่ระบาดของประเทศไทย (Kuesap et al. 2010) โดยพบว่า short (GT)_n alleles พบมากในผู้ป่วยที่มีภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีการ (Takeda et al., 2005) ซึ่งทำให้ได้สมมติฐานว่า short (GT)_n alleles อาจทำให้เสี่ยงที่จะเกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมองโดยการเพิ่มการ transcription ของฮีมออกซิจีเนส 1 ในผู้ป่วย ทำให้เพิ่มผลิตภัณฑ์จากการสลายฮีม ส่วนการศึกษาโปรโมเตอร์และระดับเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส 1 ในผู้ป่วยเด็กชาวแอฟริกันที่มีภาวะรุนแรงจากการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมพบว่าการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมเพิ่มระดับเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส 1 และแสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของยีนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส 1 และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคมาลาเรียและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของ (Walther et al. 2012) การยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส 1 จึงอาจเป็นประโยชน์สำหรับผู้ป่วยโรคมาลาเรียเนื่องจากการเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม ภายในเม็ดเลือดแดงขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุเหล็กที่ได้จากการย่อยสลายฮีมของเซลล์ผู้ป่วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์ที่เข้ารับการรักษาในสถานพยาบาลของรัฐ จำนวน 100 ราย โดยเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปริมาตร 5 มิลลิตรเพียงครั้งเดียวก่อนผู้ป่วยจะได้รับยาในการรักษา นำเลือดไปเตรียมไลต์แบบหนาและบางแล้วย้อมด้วยสียิมซ้าเพื่อตรวจหาและนับจำนวนเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งปริมาณเชื้อในกระแสเลือดที่มากกว่า 100,000 ตัวต่อไมโครลิตร สามารถจำแนกเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือดในปริมาณที่สูง (hyperparasitemia) และจัดเป็นการติดเชื้อชนิดรุนแรง (severe malaria) จากนั้นทำการหาชนิดหมู่เลือดเอบีโอของผู้ป่วยด้วยวิธีการตกตะกอน (agglutination test) สำหรับการหาชนิดของธาลัสซีเมีย ทำการส่งตรวจที่โรงพยาบาลในพื้นที่กรณีโรงพยาบาลในพื้นที่ไม่มีเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์จึงส่งตรวจที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ส่วนความชุกและรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีมออกซิเจนเนส-1 ของผู้ป่วยมาลาเรียจะวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวช-ศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

3.2 การตรวจวิเคราะห์ภาวะธาลัสซีเมีย

การตรวจคัดกรองภาวะธาลัสซีเมียโดยการวัดความเปราะบางของเม็ดเลือดแดง (osmotic fragility test: OF test) โดยดูการแตกของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.36% ซึ่งเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะแตกหมด แต่เม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย และ ฮีโมโกลบิน อี จะแตกไม่หมด อย่างไรก็ตามผู้ที่ เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 ฮีโมโกลบิน อี และ Hb CS จะให้ผลเหมือนคนปกติ การตรวจกรองจะต้องทำควบคู่กับการทดสอบยืนยัน หรือแยกชนิดด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำควบคู่กับการตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดงและการตรวจชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี LPLC การตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดง (red cell indices) เป็นการวัดปริมาณเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (mean cell volume: MCV) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจนับเม็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ (complete blood count: CBC) จะช่วยการวินิจฉัยธาลัสซีเมีย โดยคนปกติจะมีค่า 85-95 เฟมโตลิตร (fL) ผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ 2 จะมีค่า $70 + 8.7$ fL และ $85 + 5.5$ fL ตามลำดับ ในขณะที่ผู้ที่ เป็นพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียและเบต้าธาลัสซีเมียจะมีค่า $68 + 6.9$ fL และ $55 + 6.5$ fL ตามลำดับ ส่วนผู้ที่ เป็นพาหะของฮีโมโกลบิน อี จะมีค่า $84 + 5.1$ fL ส่วนการตรวจวิเคราะห์ชนิดของธาลัสซีเมียจะนำตัวอย่างเลือดครบส่วนมาตรวจแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเพื่อหาชนิดธาลัสซีเมีย ตามหลักการการตรวจแยกชนิดและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินด้วยวิธี low pressure liquid chromatography (LPLC) (automated analyzer: Hb Gold) หากตัวอย่างเลือดมีผลการตรวจว่าไม่เป็นพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบิน อี แต่มีค่า MCV ต่ำ จะทำการตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด Southeast Asia (SEA) และ Thai (THAI) และ

ตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดที่มีการขาดหายไปของยีน -3.7 kb และ -4.2 kb และชนิด non deletion Hb CS และ Hb PS

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) ด้วยชุดน้ำยา QIAamp® DNA Mini kit kit (QIAGEN, CA, USA) ตามคำแนะนำในการใช้งาน แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน

3.4 การหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีมออกซิจีเนส -1

ศึกษารูปแบบความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากผู้ป่วยไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอส่วนโปรโมเตอร์ด้วยวิธี PCR เพื่อพิจารณาขนาดของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ forward primer AGAGCCTGC AGCTTCTCAGA และ reverse primer ACAAAGTCTGGCCATAGGAC ด้วยเครื่อง PCR thermocycler (Perkin Elmer Cetus, USA) ที่ภาวะ denaturation ที่ 95°C 10 นาที ตามด้วย 95°C 30 วินาที, 61.6°C 2 นาที และ 72 °C 5 นาที จำนวน 40 รอบ แล้วต่อด้วย final extension step ที่ 72°C 10 นาที จากนั้นนำไปแยกขนาดของ PCR product โดย gel electrophoresis แล้วนำแผ่นเจลไปดูแถบดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวซ้ำๆกันของจำนวนชุดของ (GT) n ภายใต้แสงยูวี แล้ววิเคราะห์โดยแบ่งเป็นแบบสั้นและแบบยาวเทียบกับตัวอย่างมาตรฐานที่มี (GT) n จำนวน 25 ชุด โดยตัวอย่างที่มีความยาวน้อยกว่า 25 GT repeats จะจัดเป็นแบบสั้น และตัวอย่างที่มีความยาวมากกว่า 25 GT repeats จะจัดเป็นแบบยาว จากนั้นจึงนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของจำนวนชุดของ (GT) n ของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรียกับความรุนแรงของโรคมาลาเรียโดยพิจารณาความรุนแรงจากจำนวนเชื้อในกระแสเลือด

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS (version 12.0 SPSS Inc., IL, USA) โดยความถี่ของชนิดมาลาเรีย หมู่เลือดเอบีโอ ชนิดธาลัสซีเมีย ความชุกและรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีมออกซิ-จีเนส-1 ที่พบในผู้ป่วยมาลาเรีย จะแสดงผลเป็นร้อยละ การศึกษาความสัมพันธ์ของหมู่เลือดเอบีโอกับการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพาร์มและชนิดไวแวกซ์ ธาลัสซีเมียกับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย (จำนวนเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด) ความหลากหลายของจำนวนชุดของ (GT) n ของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรียกับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย รวมทั้งความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของธาลัสซีเมียกับยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ที่พบในผู้ป่วยมาลาเรีย จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Chi-square ที่ $p = 0.05$

บทที่ 4 ผลการวิจัย

จากการศึกษาตัวอย่างจากผู้ป่วยมาลาเรีย 100 ราย ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม ร้อยละ 35 เชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ร้อยละ 63 และเชื้อผสมทั้งและมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ร้อยละ 2 ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า มีค่ามัธยฐาน (ช่วง) ของจำนวนเชื้อในกระแสเลือด 4,205 (50-80,300) ตัวต่อไมโครลิตร ซึ่งแยกเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม 7,764 (355-80,300) ตัวต่อไมโครลิตร เชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ 3,618 (50-74,667) ตัวต่อไมโครลิตร และเชื้อผสมทั้งและมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ 12,820 (2,920-22,720) ตัวต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลทั่วไป		ค่าร้อยละ
ข้อมูลผู้ป่วย		
เพศ	ชาย	62
	หญิง	38
อายุ	เฉลี่ย 30 ปี	
	ไทย	26
	ต่างชาติ	74
ข้อมูลเชื้อมาลาเรีย		
ชนิดของเชื้อมาลาเรีย	ชนิดพลาสโมเดียม	35
	ชนิดไวแวกซ์	63
	ผสม (ชนิดพลาสโมเดียมร่วมกับชนิดไวแวกซ์)	2

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างหมู่เลือดเอบีโอกับการติดเชื้อมาลาเรียและความรุนแรง

การตรวจสอบชนิดหมู่เลือดเอบีโอของผู้ป่วยมาลาเรียพบว่า มีชนิดโอมากที่สุด ร้อยละ 37 รองลงมาคือชนิดบี ร้อยละ 31 ชนิดเอ ร้อยละ 25 และเอบี ร้อยละ 7 อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างหมู่เลือดเอบีโอกับการติดเชื้อมาลาเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียและหมู่เลือดเอบีโออย่างมีนัยสำคัญเช่นกันถึงแม้ว่าสัดส่วนของตัวอย่างที่มีหมู่เลือดโอที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์จะสูงกว่าหมู่เลือดโอที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมถึงสามเท่าก็ตาม สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างหมู่เลือดเอบีโอกับความรุนแรงของโรคมาลาเรียโดยวิเคราะห์จากจำนวนเชื้อในกระแสเลือดและภาวะโลหิตจาง (ระดับฮีโมโกลบินและ ฮีมาโตคริต) พบว่าสัดส่วนของกลุ่มผู้ป่วยซึ่งมี

ความเสี่ยงจะพัฒนาเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงสูงในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดแตกต่างจากหมู่เลือดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.026$) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อมาลาเรียและหมู่เลือดเอบีโอ

<i>Plasmodium</i> species	O	A	B	AB	Total
<i>P. falciparum</i>	9	11	12	3	35
<i>P. vivax</i>	27	13	19	4	63
Mixed infection of <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	1	1	0	0	2

ตารางที่ 3 แสดงการกระจายของชนิดหมู่เลือดและความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงวิเคราะห์จากจำนวนเชื้อในกระแสเลือดและภาวะโลหิตจาง (ระดับฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริต)

Variables	Distribution in ABO group			
	O	A	B	AB
Parasitemia (median and range, /ul blood):				
<i>P. falciparum</i>	15,776 (461-80,300)	7,200 (800-41,429)	9,703 (355-70,095)	1,608 (1,600-2,300)
<i>P. vivax</i>	4,705 (64-74,667)	3,909 (50-12,000)	2,583 (150-42,988)	12,075 (1,563- 12,808)
Mixed infection of <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	2,920 (2,920- 2,920)	22,720 (22,720- 22,720)	-	-
Hemoglobin (%):				
Non-anemia (male ≥ 13 , female ≥ 12 g/dL)	14	13	15	4
Mild anemia (male 11-12.9, female 11- 11.9 g/dL)	13	8	8	0
Moderate anemia (8.0-10.9 g/dL for both genders)	6	5	3	2
Severe anemia (<8.0 g/dL for both genders)	4	0	5	0
Hematocrit (%):				
$\geq 20\%$	37	26	28	6
< 20%	0	0	3	0
Risk of developing severe malaria (%):				
Low risk	30	25	25	7
High risk (parasitemia $\geq 70,000$ /ul) and/or hemoglobin (<8.0) and/or hematocrit < 20%	7	0 ^a	6	0

^a Statistically significant difference from patient with other blood groups ($p = 0.026$)

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของชนิดธาลัสซีเมียกับการติดเชื้อมาลาเรีย

การศึกษานี้พบความชุกของภาวะธาลัสซีเมียในกลุ่มตัวอย่างเท่ากับร้อยละ 30 โดยจำแนกเป็น 6 ชนิดคือฮีโมโกลบินอี (Hb E), เบต้าธาลัสซีเมีย (β -thalassemia), แอลฟาธาลัสซีเมีย-1 (α -thalassemia-1), แอลฟาธาลัสซีเมีย-2 (α -thalassemia-2), ฮีโมโกลบินอีร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 และเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 โดยชนิดที่พบมากที่สุดสองชนิดคือฮีโมโกลบินอีและแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 คิดเป็นร้อยละ 14 และ 10 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 ทั้งนี้ตัวอย่างที่เป็นแอลฟาธาลัสซีเมีย-1 พบเพียงชนิดเดียวคือ SEA deletion และตัวอย่างชนิดแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 ก็พบเพียงชนิดเดียวคือ 3.7 kb deletion

การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของธาลัสซีเมียและชนิดของมาลาเรีย จำนวนเชื้อในกระแสเลือด ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (MCV) และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) พบว่าพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ที่มีภาวะธาลัสซีเมียชี้ให้เห็นถึงผลกระทบที่มีนัยสำคัญต่อการติดเชื้อมาลาเรีย โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าฮีมาโตคริตระหว่างผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีและมีภาวะธาลัสซีเมียร่วมด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4 และพบว่าค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยที่มีภาวะธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินอี, แอลฟาธาลัสซีเมีย-2 และเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะธาลัสซีเมียชนิดอื่นและผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะธาลัสซีเมีย สำหรับค่าเฉลี่ยของน้ำหนักฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินอี, เบต้าธาลัสซีเมีย และเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะธาลัสซีเมียชนิดอื่นและผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะธาลัสซีเมีย

การหาความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อมาลาเรียที่มีและไม่มีภาวะธาลัสซีเมีย และภาวะโลหิตจาง (non-anemia, mild anemia, moderate anemia และ severe anemia) แสดงผลในตารางที่ 5 ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้ป่วยมาลาเรียที่มีและไม่มีภาวะธาลัสซีเมีย โดยเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมียมีความสัมพันธ์กับภาวะโลหิตจางอย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีภาวะธาลัสซีเมียมีสัดส่วนของมาลาเรียชนิดรุนแรงน้อยกว่าผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะธาลัสซีเมียร่วมด้วยอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 ความชุกของภาวะธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรีย 100 ราย

Thalassemia	Number (%)	Malaria Type			Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)
		PF	PV	Mixed				
Malaria with thalassemia:	30	9	20	1	11.5 (5.1-14.3)	34.3 (15.9-44.1)	71.0 (53.0-91.0)	23.2 (15.2-30.2)
Hb E	14	3	10	1	11.8 (7.8-14.3)	35.5 (21.9-43.0)	73.5 (63.0-83.0) ^b	24.1 (20.5-27.4) ^f
β -thalassemia	1	1	0	0	6.0 (6.0-6.0)	18.0 (18.0-18.0)	58.0 (58.0-58.0)	18.7 (18.7-18.7) ^g
α -thalassemia 1	1	1	0	0	12.7 (12.7-12.7)	41.3 (41.3-41.3)	68.7 (68.7-68.7)	21.2 (21.2-21.2)
α -thalassemia 2	10	3	7	0	12.0 (5.1-14.3)	35.5 (15.9-44.1)	73.5 (53.0-91.0) ^c	23.8 (15.2-30.2)
Hb E/ α -thalassemia 2	1	0	1	0	7.6 (7.6-7.6)	24.0 (24.0-24.0)	62.0 (62.0-62.0)	19.7 (19.7-19.7)
β/α -thalassemia 2	3	1	2	0	10.9 (9.8-11.1)	33.6 (28.3-34.3)	67.0 (60.0-67.0) ^d	21.3 (19.6-22.7) ^h
Malaria without thalassemia:	70	26	43	1	12.4 (3.4-17.7)	37.7 (10.7-55.1) ^a	84.5 (50.0-101.0) ^e	27.80 (20.8-32.3) ⁱ

PF = *P. falciparum*, PV = *P. vivax*, Hb = hemoglobin, Hct = hematocrit, MCV = mean corpuscular volume (MCV), MCH = mean corpuscular hemoglobin

^a Statistically significant difference from samples with thalassemia ($p= 0.006$)

^b Statistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.002$)

^c Statistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.045$)

^d Statistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.007$)

^e Statistically significant difference from samples with thalassemia ($p< 0.001$)

^f Statistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.001$)

^g Statistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.043$)

^h Statistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.006$)

ⁱ Statistically significant difference from patients with thalassemia ($p< 0.001$)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของภาวะธาลัสซีเมียและโลหิตจางในผู้ป่วยมาลาเรีย

Thalassemia	Non-anemia	Anemic status Mild anemia	Moderate anemia	Severe anemia
Malaria with thalassemia ^a :	10	7	7	6
Hb E	6	2	4	2
β -thalassemia ^b	0	0	0	1
α -thalassemia 1	0	1	0	0
α -thalassemia 2	4	3	1	2
Hb E/ α -thalassemia 2 ^c	0	0	0	1
β / α -thalassemia 2	0	1	2	0
Malaria without thalassemia:	36	20	11	3 ^d

^a Statistically significant difference from patients with thalassemia ($p= 0.016$)

^b Statistically significant difference from patients with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.023$)

^c Statistically significant difference from patients with other types of thalassemia and without thalassemia ($p= 0.023$)

^d Statistically significant difference from patients with other types of thalassemia ($p= 0.019$)

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนฮีมออกซิจีเนส-1 และความรุนแรงของโรคมาลาเรีย

จำนวนชุดของเบส GT ที่ซ้ำกัน ((GT) n repeat) ของส่วนโปรโมเตอร์ของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ของผู้ป่วยมาลาเรียในการศึกษานี้อยู่ระหว่าง 13-39 ซึ่งสามารถจำแนกความยาวของยีนได้เป็น 2 แบบคือ แบบสั้น (S: 13-26 repeats) และแบบยาว (L: 27- 39 repeats) จากนั้นจำแนกจีโนไทป์ออกเป็น 3 แบบ S/S, S/L และ L/L ดังแสดงในตารางที่ 6 อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างยีนฮีมออกซิจีเนส-1 และความเสี่ยงในการเกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง

ตารางที่ 6 ความถี่ของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 และความรุนแรงของมาลาเรีย ในตัวอย่าง 100 ราย

	Number	Malaria species			Malaria Severity	
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Mixed	UM	RSM
		infection				
Alleles, n (%)						
S	112 (56)					
L	88 (44)					
Genotypes, (%)						
S/S	25	8	16	1	22	3
S/L	62	25	37	0	53	9
L/L	13	2	10	1	12	1

UM = uncomplicated malaria, RSM = risk to severe malaria

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างหมู่เลือดเอบีโอ ภาวะธาลัสซีเมีย ยีนฮีมออกซิจีเนส-1 และ ความรุนแรงของมาลาเรีย

การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยของผู้ป่วยสามชนิดในผู้ป่วยมาลาเรีย 100 ราย นั้น พบว่าหมู่เลือดเอบีโอไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะธาลัสซีเมีย ($p = 0.149$) รวมทั้งไม่มีความสัมพันธ์กับยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ($p = 0.890$) และภาวะธาลัสซีเมียไม่มีความสัมพันธ์กับยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ($p = 0.811$)

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

สัดส่วนการกระจายตัวของหมู่เลือดที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียในการศึกษานี้มีรูปแบบเดียวกับการกระจายตัวที่มีการรายงานในประเทศไทย (Chandanayingyong et al. 1967, Nathalang et al. 2001, Palacajornsuk et al. 2017) โดยหมู่เลือดที่พบมากที่สุดคือหมู่เลือดโอ คิดเป็นร้อยละ 37 ทั้งนี้หมู่เลือดที่พบมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมคือหมู่เลือด บี และหมู่เลือดที่พบมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์คือหมู่เลือดโอ โดยสัดส่วนของของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ที่มีหมู่เลือดโอสูงกว่าผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่มีหมู่เลือดโอถึงสามเท่า ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าผู้ที่มิหมู่เลือดโอจะมีความไวในการติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์สูงกว่ามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ส่วนผู้ป่วยมาลาเรียที่มีแอนติเจนเอบนเม็ดเลือดแดงทั้งผู้ที่มีหมู่เลือดเอและเอบี จะไม่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่มีแอนติเจนเอบนเม็ดเลือดแดงจะสามารถป้องกันการเกิดมาลาเรียชนิดรุนแรงได้ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะธาลัสซีเมียและโรคมาลาเรียมีการศึกษาและแสดงให้เห็นว่าธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมได้ ได้แก่ ชนิดฮีโมโกลบินอี (Chotivanich et al. 2002), แอลฟาธาลัสซีเมีย (Weatherall 1997, Wambua et al. 2006) และเบต้าธาลัสซีเมีย (Pasvol et al. 1976, Pantaleo et al. 2012) ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นภาวะธาลัสซีเมียที่พบได้มากคือฮีโมโกลบินอี (Fucharoen et al. 1987) สำหรับการศึกษาชนิดของธาลัสซีเมียที่พบมากที่สุดในการศึกษาผู้ป่วยมาลาเรียทั้งชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์ที่ศึกษาคือฮีโมโกลบินอีและแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 โดยชนิดของธาลัสซีเมียที่แตกต่างกันก็มีผลต่อมาลาเรียแตกต่างกันด้วย จากการศึกษาพบว่าเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 มีความเกี่ยวข้องกับภาวะโลหิตจางแบบรุนแรงและความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีมออกซิจีเนสและมาลาเรียมีการศึกษาในบางกลุ่มประชากร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนฮีมออกซิจีเนสที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับมาลาเรียชนิดรุนแรงในผู้ป่วยเด็กชาวแอมเบียน (Walther et al. 2012) การเกิดมาลาเรียขึ้นสมองในผู้ป่วยชาวมาลาเวีย (Clark et al. 2003) การเกิดมาลาเรียชนิดรุนแรงในผู้ป่วยชาวพม่า (Takeda et al. 2005) และผู้ป่วยเด็กชาวแองโกลาน (Sambo et al. 2010) ทั้งนี้สมมติฐานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีมออกซิจีเนสและความรุนแรงของโรคมาลาเรียได้มีการกล่าวถึงในปี ค.ศ. 2002 (Shibahara et al. 2002, Shibahara 2003) จากนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อสนับสนุนสมมติฐานดังกล่าวโดยศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของจำนวนชุดของเบส GT หรือ (GT)_n repeat ของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 กับความรุนแรงของโรคมาลาเรียในชาวกะเหรี่ยงซึ่งเป็นชนกลุ่มน้อยในประเทศพม่า (Takeda et al. 2005) และในชาวไทย พม่าและกะเหรี่ยงในประเทศไทย (Kuesap et al. 2010) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียชาวกะเหรี่ยงที่มี(GT)_n

สัณจะพบมากในผู้ป่วยที่มีภาวะมาลาเรียขึ้นสมองเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ (Takeda et al. 2005) และพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ยีนฮีมออกซิจีเนส-1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้ป่วยมาลาเรียชาวไทย พม่าและกะเหรี่ยง ไทย (Kuesap et al. 2010) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคมาลาเรียในผู้ป่วยแต่ละเชื้อชาติ อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ ชนิดหมู่เลือด ธาลัสซีเมีย รวมทั้งความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 และความรุนแรงของโรคมาลาเรียในการศึกษานี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสามและความรุนแรงของโรคมาลาเรีย ซึ่งอาจอธิบายได้จากความชุกของจีโนไทป์ของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 แบบ S/S ที่พบได้น้อยในกลุ่มประชากรที่ศึกษา และมีอัตราส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์สูง ซึ่งปกติผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์จะมีจำนวนเชื้อในกระแสเลือดน้อยกว่าผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

สรุปผลจากการศึกษานี้พบว่าการติดเชื้อมาลาเรียในสภาวะที่เม็ดเลือดแดงมีภาวะเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 จะมีความเสี่ยงที่จะพัฒนาเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรง ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเอและเอบีมีแนวโน้มที่จะช่วยป้องกันจากการพัฒนาเป็นโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในประชากรกลุ่มเล็กจึงควรมีการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มากขึ้นเพื่อยืนยันถึงความสัมพันธ์และความสำคัญของปัจจัยทั้งสามของผู้ป่วยทั้งชนิดของหมู่เลือด ธาลัสซีเมีย และความหลากหลายของยีนฮีมออกซิจีเนส-1 ในผู้ป่วยมาลาเรียต่อไป

บรรณานุกรม

- Campino S, Kwiatkowski D, Dessein A. Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. *Semin Immunol.* 2006; 18: 411–22.
- Chandanayingyong D, Sasaki T, and Greenwalt T. Blood groups of the Thais. *Transfusion* 1967; 7 (4): 269–276.
- Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, White N.. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P. falciparum* malaria. *Blood* 2002; 100(4):1172-6.
- Clark A, Awburn M, Harper G, Liomba G, Molyneux E. Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal *falciparum* malaria and sepsis. *Malar J* 2003; 2: 41.
- Cserti CM, Dzik WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood.* 2007; 110, 2250–2258.
- Deepa VA, Rameshkumar K, Ross C. ABO blood groups and malaria related clinical outcome. *J. Vector Borne Dis.* 2011; 48, 7–11.
- Fischer PR, Boone P. Short report: severe malaria associated with blood group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58, 122–123.
- Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin* 1987; 11: 65-88.
- Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia and abnormal haemoglobin. *Int J Hematol.* 2002; 76 (suppl 2):83-9.
- Genton B, al-Yaman F, Mgone CS, Alexander N, Panju MM, Alpers MP, Mokela D.. Ovalocytosis and cerebral malaria. *Nature.* 1995; 378, 564–565.
- Grau E, Taylor E, Molyneux E, Wirima, Vassalli P, Hommel M and Lambert H. "Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria." *N Engl J Med.* 1989; 320(24): 1586-1591.
- Guindo A, Fairhurst M, Doumbo K, Wellems E and Diallo A. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med.* 2007; 4(3): e66.
- Gupte S, Patel A and Patel T. Association of ABO groups in malaria infection of variable severity. *J Vector Borne Dis.* 2012; 49, 78–81.
- Kamolratanakul P, Dhanamun B, Lertmaharit S, Seublingwong T, Udomsangpetch R and Thaithong S. Epidemiological studies of malaria at Pong Nam Ron, eastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994; 25: 425-29.

- Kuesap J, Hirayama K, Kikuchi M, Ruangweerayut R and Na-Bangchang K. Study on association between genetic polymorphisms of haem oxygenase-1, tumour necrosis factor, cadmium exposure and malaria pathogenicity and severity. *Malar J* 2010; 9: 260.
- Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herlich K, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Bienzle U, Kremsner PG. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28, 794–799.
- Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Meyer CG, Falusi AG, Bienzle U. Evidence for a reduced effect of chloroquine against *Plasmodium falciparum* in alpha-thalassaemic children. *Tropical medicine & international health : TM & IH.* 2001 Feb;6(2):102-7
- Nacher M, Carrara VI, McGready R, et al. Seasonal fluctuations in the carriage of *Plasmodium vivax* gametocytes in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 2004;98:115-20.
- Nagel RL, Raventos-Suarez C, Febby ME, Tonowitz H, Sicard D, Labie D. Impairment of the growth of *P. falciparum* in HbEE erythrocytes. *J Clin Invest.* 1981;68:303-305.
- Nathalang O, Kuvanont S, Punyaprasiddhi P, Tasaniyanonda C, and Sriphaisal T. A preliminary study of the distribution of blood group systems in Thai blood donors determined by the gel test. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32 (1): 204–207.
- Newton CR and Krishna S. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 1-53.
- O'Donnell J , Laffan M A . The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med.* 2001;11(4):343–51.
- Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looareesuwan S, et al. Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *American journal of human genetics.* 2004 Jun;74(6):1198-208.
- Palacajornsuk P, Somsak P. Screening of ABO, Rh typing and unexpected alloantibodies in pregnant women attending antenatal care at Sriphat Medical Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. *Journal of Associated Medical Sciences* 2017; 50 (2): 153-158.
- Panda AK, Panda SK, Sahu AN, Tripathy R, Ravindran B, Das BK. Association of ABO blood group with severe falciparum malaria in adults: case control study and meta-analysis. *Malar. J.* 2011; 19 (10), 309.
- Pantaleo A, Ferru E, Carta F, Valente E, Pippia P, Turrini F. Effect of heterozygous beta thalassemia on the phosphorylative response to *Plasmodium falciparum* infection. *J Proteomics* 2012;76 Spec No.:251-8.

- Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, Gilles HM. Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet* 1976; 1, 1269–1272.
- Pathirana SL, Alles HK, Bandara S, Phone-Kyaw M, Perera MK, Wickremasinghe AR, Mendis KN, Handunnetti SM. ABO-bloodgroup types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2005;99, 119–124.
- Reid ME, Bird GW. Associations between human red cell blood group antigens and disease. *Transfus Med Rev.* 1990;4:47–55.
- Rout R, Dhangadamajhi G, Ghadei M, Mohapatra N, Kar K, Ranjit M. Blood group phenotypes A and B are risk factors for cerebral malaria in Odisha, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Sep;106(9):538-43.
- Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans AM, Lyke KE, Kone A, Diallo DA, Raza A, Kai O, Marsh K, Plowe CV, Doumbo OK, Moulds JM. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104, 17471–17476.
- Sambo R, Trovada MJ, Benchimol C, Quinhentos V, Gonçalves L, Velosa R, Marques MI, Sepúlveda N, Clark TG, Mustafa S, Wagner O, Coutinho A, Penha-Gonçalves C. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PLoS One* 2010; 5:e11141.
- Schluesener HJ, Kremsner PG and Meyermann R. Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; 101: 65-68.
- Shibahara S, Kitamuro T, Takahashi K. Heme degradation and human disease: diversity is the soul of life. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 593-602.
- Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2003, 200: 167-86.
- Stevenson M and Riley M. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(3): 169-180.
- Tadesse H1, Tadesse K. Assessing the association of severe malaria infection and ABO blood groups in northwestern Ethiopia. *J Vector Borne Dis.* 2013;50(4):292-6.
- Takeda M, Kikuchi M, Ubalee R, Na-Bangchang K, Ruangweerayut R, Shibahara S, Imai S, Hirayama K. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(5): 268-271.
- Tekeste Z, Petros B. The ABO blood group and *Plasmodium falciparum* malaria in Awash, Metehara and Ziway areas, Ethiopia. *Malar J.* 2010; 9, 280.
- Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61: 748-55.

- Vento S, Cainelli F, Cesario F. Infections and thalassaemia. *The Lancet Infectious diseases*. 2006 Apr;6(4):226-33.
- Walther M, De Caul A, Aka P, Njie M, Amambua-Ngwa A, Walther B, Predazzi IM, Cunningham A, Deininger S, Takem EN, Ebonyi A, Weis S, Walton R, Rowland-Jones S, Sirugo G, Williams SM, Conway DJ. HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002579.
- Wambua S, Mwangi TW, Kortok M, Uyoga SM, Macharia AW, Mwacharo JK, Weatherall DJ, Snow RW, Marsh K., Williams TN. The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Med* 2006; 3: 643–651.
- Weatherall J. Thalassaemia and malaria, revisited. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; 91(7): 885-890.
- Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ. Malaria and the red cell. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2002; 1, 35–57.
- Weatherall J. "Thalassaemia and malaria, revisited." *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; 91(7): 885-890.
- Wolofsky KT, Ayi K, Branch DR, Hult AK, Olsson ML, Liles WC, Cserti-Gazdewich CM, Kain KC. ABO blood groups influence macrophage-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (10), e1002942.
- World Health Organisation. World Malaria Report 2013. Available: http://who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/ Accessed 2012 Sep 18.
- Yeo TW, Lampah DA, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Anstey NM. Increased carboxyhemoglobin in adult *falciparum* malaria is associated with disease severity and mortality. *J Infect Dis*. 2013;208(5):813-7.
- Yuthavong Y, Wilairat P. Protection against malaria by thalassaemia and haemoglobin variants. *Parasitology today*. 1993 Jul;9(7):241-5.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

ส่ง manuscript เรื่อง The effect of ABO blood groups, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 polymorphisms on malaria susceptibility and severity

ตีพิมพ์ในวารสาร Korean Journal of Parasitology ISSN:0023-4001E-ISSN:1738-0006

Subject area: Medicine: Infectious Diseases ซึ่งเป็นวารสารที่อยู่ในฐาน ISI Web of Knowledge

- Journal Citation Reports (JCR) 2016 = quartile 4

- CiteScore 2016 = 1.21

- SCImago Journal Rank (SJR) 2016 = 0.508

- Source Normalized Impact per Paper (SNIP) 2016 = 0.709

ขณะนี้อยู่ระหว่างการพิจารณา

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

มีการนำไปใช้ในการสอนและสร้างนักวิจัยใหม่ ในวิชา ทน. 481 งานวิจัยทางเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ โดยให้นักศึกษาระดับปริญญาตรีสองคนได้ฝึกการศึกษาวิจัยในหัวข้อความหลากหลายของยีนฮีโมออกซีจีเนส 1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย

รวมทั้งมีแผนจะนำความรู้และเทคนิคจากการศึกษาวิจัยนี้ไปสอนให้กับนักศึกษาจาก University of Santo Tomas, Philippines ในการฝึกฝนการทำวิจัยโดยกำหนดหัวข้อวิจัยเรื่อง Heme oxygenase-1 polymorphism in malaria patients in Thailand โดยจะเริ่มในเทอมที่ 2 ของปีการศึกษา 2560 ประมาณวันที่ 15 มกราคม- 2 กุมภาพันธ์ 2561

และเมื่อผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์แล้วจะสามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษาในวิชาที่เกี่ยวข้อง เช่น BM673 Tropical Diseases

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

- การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมประจำปี ครั้งที่ 16 “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส” วันที่ 11-13 มกราคม 2560 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

- การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 39 ในหัวข้อ “Illustrious Issues in Pharmacology 2017” โดยสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยและมหาวิทยาลัยบูรพา วันที่ 18 เดือน พฤษภาคม 2560 ถึงวันที่ 20 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560 ณ ศูนย์ประชุมบางแสน เฮอริเทจ บางแสน จ.ชลบุรี

บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เจริญวิทย์อาวุโส สกว.
ครั้งที่ 16

วันที่ 11-13 มกราคม พ.ศ. 2560

โรงแรมเดอะรีเจ้นท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท

จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

“นักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 16

Physical Sciences | Biological Sciences | Engineering Sciences

วันที่ 11-13 มกราคม พ.ศ. 2560

ณ โรงแรมเดอะรีเจ้นท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
The Thailand Research Fund



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Office of the Higher Education Commission

The Effect of Blood Groups, Hemoglobin Type and Heme Oxygenase-1 Polymorphism in Malaria Susceptibility and Severity

Kuesap, J.^{1*}, Na-Bangchang K.²

¹Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani 12121, Thailand

²Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathumthani 1212, Thailand 1

Abstract

Malaria is one of the most important public health problems in the tropical areas of the world. Several factors affect malaria disease severity including innate immunity such as blood group, hemoglobinopathies, and heme oxygenase-1 (HO-1) polymorphism. The association between ABO blood group, thalassemia and HO-1, and malaria disease has been reported in some populations. Association between susceptibility and severity of malaria infection and polymorphism of HO-1 has been demonstrated. Thalassemia is associated with abnormal erythrocyte that might influence iron supply for malaria parasites growth. The aim of the current study was to examine the prevalence of various blood groups, thalassemia, and HO-1 polymorphism in malaria patients (80% Burmese and Karen ethnics) who resided along the border areas of Thailand. Preliminary investigation revealed that *Plasmodium vivax* was the major malaria species (63%). The distribution of ABO blood groups varied among different ethnics. Twenty-three percents were HbE, beta-thalassemia and type 2 alpha-thalassemia were detected in 23%, 3% and 14%, respectively. Data analysis is underway to investigate the relationship of these genotypic variants and malaria disease susceptibility and severity.

Keywords: Malaria, blood group, thalassemia, heme oxygenase

*Corresponding author.

Tel.: 0-2564-4440-79 ext. 1800; Fax: 0-2564-4398

E-mail: kesaratmu@yahoo.com



การประชุมวิชาการสมาคมเภสัชวิทยา ครั้งที่ 39
สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ร่วมกับ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
วันที่ 18-20 พฤษภาคม 2560
ณ โรงแรมบางแสนเฮอริเทจ บางแสน ชลบุรี และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

วันที่ 20 เมษายน พ.ศ. 2560

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาบทความ/บทความวิจัย

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราภรณ์ คัยทรัพย์

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานเพื่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยครั้งที่ 39 นั้น บัดนี้ ทางผู้จัดงานประชุมฯ มีความยินดีที่จะแจ้งให้ท่านทราบว่า ผลงานบทความ (abstract) ในหัวข้อดังต่อไปนี้ ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว และจะได้รับการตีพิมพ์ในหนังสือ Proceedings ของงานประชุมต่อไป

หัวข้อ: The Prevalence of Hemoglobin Type in Malaria Susceptibility and Severity

ผู้นิพนธ์: Jiraporn Kuesap, Kesara Na-Bangchang

ทั้งนี้ ทางผู้จัดงานประชุมฯ ขอขอบพระคุณอีกครั้งที่ท่านได้มีส่วนร่วมในงานประชุมฯ ครั้งนี้ และขอเรียนเชิญท่านเข้าร่วมประชุมเพื่อนำเสนอผลงานดังกล่าวในรูปแบบโปสเตอร์ โดยท่านสามารถดูรายละเอียดเกี่ยวกับการนำเสนอผลงานได้ดังเอกสารที่แนบมาพร้อมนี้ ส่วนหมายเลขลำดับโปสเตอร์จะแจ้งให้ท่านทราบอีกครั้งภายในวันที่ 12 พฤษภาคม 2560

ขอแสดงความนับถือ

(เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสรีระ)

ประธานคณะกรรมการจัดการประชุม

A27

The Prevalence of Hemoglobin Type in Malaria Susceptibility and Severity

Jiraporn Kuesap¹, Kesara Na-Bangchang²

¹ Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

² Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

Abstract

Malaria is a mosquito-borne infectious disease affecting humans by parasites of the genus *Plasmodium*. Hemoglobinopathies are one of the factors that affect malaria disease severity. Thalassemia is associated with abnormal erythrocyte that might influence iron supply for malaria parasites growth. The association between thalassemia and malaria disease has been reported in some populations. The coexistence of thalassemia and malaria was reported to protect the infected host against malaria caused by *Plasmodium falciparum* in several areas but not by *P. vivax* in Papua New Guinea. The aim of the current study was to examine the prevalence of thalassemia in malaria patients who resided along the border areas of Thailand. Hemoglobin typing was performed using low pressure liquid chromatography (LPLC) and α -thalassemia was confirmed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) methods. Thirty percent of HbE, β -thalassemia and type 2 α -thalassemia were detected. Malaria patients with β -thalassemia and HbE with type 2 α -thalassemia are more likely to develop severe malaria. Further study with increasing sample size is needed to confirm the effect of thalassemia on malaria patients in Thai endemic areas.

Keywords: Malaria, thalassemia, hemoglobin E



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของยีนฮีโมออกซีจีเนส 1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย

Genetic polymorphism of heme oxygenase-1 gene
in malaria patients

นายชุตีพงศ์ บุญลือ
นางสาวจุฑาภรณ์ จันทร์คง

วิชา ทน. 481 งานวิจัยทางเทคนิคการแพทย์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2560

แบบเสนอรายงานการวิจัยของนักศึกษาชั้นปีที่ 4
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2560

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) ความหลากหลายของยีนฮีโมออกซีจีเนส 1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย
ชื่อเรื่อง (ภาษาอังกฤษ) Genetic polymorphism of heme oxygenase-1 gene in malaria patients
ชื่อผู้วิจัย นายชุตติพงศ์ บุญลือ
นางสาวจุฑาภรณ์ จันทร์คง
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราภรณ์ คุ้ยทรัพย์
หน่วยงาน หน่วยเภสัชวิทยาและพิษวิทยา บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เนื่องจากการทำวิจัยได้เสร็จสิ้นเรียบร้อยแล้ว ข้าพเจ้าได้เสนอรายงานการวิจัยฉบับนี้ เพื่อขอความเห็นชอบ
จากอาจารย์ที่ปรึกษาว่าเป็นรายงานการวิจัยที่สมบูรณ์ สามารถส่งมอบให้คณะฯ เพื่อเผยแพร่ให้นักศึกษารุ่นต่อไปได้

ลงชื่อ.....
(นายชุตติพงศ์ บุญลือ)

ลงชื่อ.....
(นางสาวจุฑาภรณ์ จันทร์คง)

ความเห็นชอบของอาจารย์ที่ปรึกษา

ได้ตรวจดูแล้ว เห็นชอบว่าเป็นรายงานที่สมบูรณ์ สามารถส่งมอบให้คณะฯ ได้

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราภรณ์ คุ้ยทรัพย์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ

ความหลากหลายของยีนฮีมออกซีจีเนส 1 ในผู้ป่วยมาลาเรีย

ชุตติพงศ์ บุญลือ¹, จุฑามรรณ จันทรคง¹, จิราภรณ์ คัยทรัพย์²

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

²เภสัชวิทยาและพิษวิทยา บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิตในจิ้งนัสพลาสโมเดียม ในประเทศไทยโรคมาลาเรียส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์ โดยเชื้อจะอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงและใช้เหล็กเป็นปัจจัยส่งเสริมการเติบโตและเพิ่มจำนวน เอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส มีความสำคัญในกระบวนการสลายฮีม ได้ผลิตภัณฑ์คือ บิลิเวอร์ดิน คาร์บอนมอนอกไซด์ และเหล็ก การแสดงออกของยีนโดยเฉพาะส่วนโปรโมเตอร์ที่มีการซ้ำกันของเบสจีทีที่ต่างกัน ทำให้การแสดงออกของเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส 1 ในแต่ละบุคคลต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อความรุนแรงของโรคมาลาเรียในผู้ป่วยต่างกันด้วย ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนฮีมออกซีจีเนส 1 ในผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทย โดยวิเคราะห์จำนวนชุดของเบสจีทีที่ซ้ำกัน ในผู้ป่วยมาลาเรีย 200 ราย จากจังหวัดกาญจนบุรีและยะลา ด้วยวิธีพีซีอาร์ ผลการวิเคราะห์พบว่าผู้ป่วยมีจีโนไทป์ 3 แบบคือ LL (153 ราย ร้อยละ 76.5) LS (28 ราย ร้อยละ 14) และ SS (19 ราย ร้อยละ 9.5) โดยผู้ป่วยจากจังหวัดยะลาจะมีลักษณะจีโนไทป์แบบ SS สูงกว่าผู้ป่วยในจังหวัดกาญจนบุรี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.008$) ซึ่งสอดคล้องกับการระบาดของมาลาเรียในจังหวัดยะลาในช่วงเวลาที่ศึกษาดังนั้นความหลากหลายของยีนฮีมออกซีจีเนส 1 ในผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทยอาจเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย อีกทั้งฮีมออกซีจีเนส 1 อาจเป็นโมเลกุลเป้าหมายของยาต้านมาลาเรียได้

คำสำคัญ: ฮีมออกซีจีเนส 1, จำนวนชุด จีที, มาลาเรีย, และมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

Preview

From: kjp.editor@gmail.com

To: kesaratmu@yahoo.com, wn_ap39@yahoo.com

CC:

Subject: Korean Journal of Parasitology - Manuscript ID 17-227-OA

Body: 06-Nov-2017

Dear Professor Na-Bangchang:

Your manuscript entitled "The effect of ABO blood groups, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 polymorphisms on malaria susceptibility and severity" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Korean Journal of Parasitology.

Your manuscript ID is 17-227-OA.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/kjp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/kjp>.

Thank you for submitting your manuscript to the Korean Journal of Parasitology.

Sincerely,
Korean Journal of Parasitology Editorial Office

Date Sent: 06-Nov-2017

 Close Window

Author Dashboard

1 Submitted Manuscripts

27 Manuscripts with Decisions

Start New Submission

Legacy Instructions

5 Most Recent E-mails

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EO: Lee, So-Jung	17-227-OA	The effect of ABO blood groups, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 polymorphisms on malaria susceptibility and severity	06-Nov-2017	12-Nov-2017
✱ Awaiting Reviewer Assignment		View Submission		
		Cover Letter		



The effect of ABO blood groups, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 polymorphisms on malaria susceptibility and severity

Journal:	<i>Korean Journal of Parasitology</i>
Manuscript ID	17-227-OA
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	12-Nov-2017
Complete List of Authors:	Kuesap, Jiraporn; Thammasat University, Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences Na-Bangchang, Kesara; Thammasat University, Chulabhorn International College of Medicine

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

The effect of ABO blood groups, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 polymorphisms on malaria susceptibility and severity

Running head: Blood groups, hemoglobinopathy and HO-1 on malaria diseases

Jiraporn KUESAP¹ and Kesara NA-BANGCHANG^{2*}

¹ Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

² Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

Corresponding author

Professor Dr.Kesara Na-Bangchang
Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University
99 Moo 18 Klongnung, Klongluang, Pathumthani, Thailand 12121
Tel. 662-5644440 ext. 1800
e-mail: kesaratmu@yahoo.com

Abstract:

Malaria is one of the most important public health problems in tropical areas of the world. Several factors are associated with susceptibility to malaria and disease severity, including innate immunity such as blood group, hemoglobinopathy, and heme oxygenase-1 (HO-1) polymorphisms. The aim of the study was to investigate the association of ABO blood group, thalassemia types, and HO-1 polymorphisms in malaria infected blood samples collected from areas along the Thai-Myanmar border. Determination of ABO blood group, thalassemia variants, and HO-1 polymorphisms were performed using agglutination test, low pressure liquid chromatography and polymerase chain reaction, respectively. *Plasmodium vivax* was the major infected malaria species in the study samples. The distribution of ABO blood group in malaria infected samples was found to be similar to that previously reported in healthy subjects, of which blood group O being the most prevalent group. Significant association between blood group A and decreased risk of severe malaria was found. Six thalassemia types (30%) were detected, *i.e.*, hemoglobin E (HbE), β -thalassemia, α -thalassemia 1, α -thalassemia 2, HbE with α -thalassemia 2, and β -thalassemia with α -thalassemia 2. Malaria infected samples without thalassemia showed significantly higher risk to severe malaria. The prevalence of HO-1 polymorphisms, S/S, S/L and L/L were 25, 62 and 13%, respectively. Further study with larger sample size is required to confirm the impact of these three host genetic factors in malaria patients.

Keywords: Malaria, ABO blood group, thalassemia, heme oxygenase

Introduction

The widespread of malaria infection is a major public health problem in tropical and sub-tropical areas especially in Africa and Southeast Asia including Thailand. Several host factors such as innate immunity [1], hemoglobinopathy [2], and heme oxygenase (HO) polymorphisms [3, 4] were investigated for the possible relationship with susceptibility to malaria and disease severity. Different geographic distributions and different ethnic populations are associated with different genetic variants to protect malaria [5]. The *Plasmodium* parasites are directly related to host red blood cells and therefore pathology of red blood cells could be expected to influence malaria infection and severity.

The possible association between patient ABO blood groups and malaria development and severity has been suggested since 1957. The frequencies of blood group antigens were determined in Nigerian children with severe falciparum malaria [6, 7]. The relationship between ABO blood group and severity of malaria disease was also investigated in other populations with the focus on *Plasmodium falciparum* infection [8-13]. Significant association between ABO blood group and severe *P. falciparum* infection was demonstrated in different populations, *i.e.*, in patients with blood group A in Zimbabwe [8], Gabon [9] and Ethiopia [10], in patients with blood group AB in Sri Lanka [11], Mali [12] and Ethiopia [10], and in patients with blood group B in India [13]. Falciparum malaria patients with blood group O was shown to be significantly associated with protection against cerebral malaria, whereas those with blood groups A and B was significantly associated with increased risk of developing cerebral malaria in Indian population [14]. The association between ABO blood group and anemia induced by *Plasmodium vivax* infection was investigated in Brazilian patients and results suggested increased susceptibility to anemia in *P. vivax* patients with blood group O [15].

Thalassemia is a hemoglobinopathy caused by the alterations of globin chain synthesis that is classified into two forms based on the abnormality of globin chains, *i.e.*, α and β -thalassemia. Thalassemia is widely distributed and commonly found in malaria endemic areas [16]. Previous studies demonstrated protective effect against malaria of thalassemic red cells including hemoglobin E [17], α -thalassemia [2, 18], and β -thalassemia [19, 20].

The association between human heme oxygenase-1 (HO-1) polymorphisms and malaria infection was described in a few studies in different populations, *i.e.*, Gambian [21], Malawian [22], Angolan [23], and Burmese [3] populations. HO-1 is an inducible enzyme responsible for the breakdown of heme, mainly from hemoglobin into carbonmonoxide (CO), biliverdin, and iron [24]. The HO-1 gene promoter contains a polymorphic (GT)_n repeat which influences the expression level of HO-1 enzyme. HO-1 is beneficial for malaria parasite for growth and survival within red blood cells, for iron supply from the hemoglobin degradation process. The malaria parasite lacks HO-1 and is unable to cleave heme to release iron. In malaria infected thalassemic red cells particularly those with Hb E, the most common types in Thai population [17, 25], the property of red blood cells is changed from normal which might affect iron supply for malaria parasite [26], and as a consequence the level of HO-1.

The aim of the study was to investigate the association of ABO blood group, thalassemia variants, and HO-1 polymorphisms in malaria infected blood samples collected from areas along the Thai-Myanmar border.

Materials and methods

Study subjects and sample collection

A total of 100 blood samples (5 ml each) were collected from patients (62 males and 38 females, 27 Thais and 73 Burmeses, aged 18-60 years) with mono- or mixed infection with *P. falciparum* and/or *P. vivax* who attended malaria clinics and general hospitals in malaria endemic areas along the Thai-Myanmar (Kanchanaburi and Ranong provinces). The study protocol was approved by the Ethics Committee of Thammasat University (COA No.012/2558). Giemsa-stained thin and thick blood smears were prepared and examined under the light microscope for the presence of malaria parasites.

Analysis of ABO blood groups

ABO blood group was determined in all malaria infected blood samples by standard agglutination test using agglutinating A, B, and AB monoclonal anti-sera obtained from The Thai Red Cross Society (Bangkok, Thailand).

Analysis of thalassemic variants and other hematological parameters

Osmotic hemolysis of malaria infected red blood cells was screened by osmotic fragility test (OF test). Hemoglobin typing was performed using automated low pressure liquid chromatography (LPLC) (Automated analyzer: Hb Gold, Cumbria, UK). The common α -thalassemia variants α -thalassemia-1 (SEA and Thai), α -thalassemia-2 (3.7 and 4.2), and Hb constant spring were analyzed using multiplex polymerase chain reaction (PCR). The hematological parameters including hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), and mean corpuscular hemoglobin (MCH) were analyzed using hematology analyzer (DxH, Coulter, Miami, USA).

Analysis of severity of anemic status and malaria disease severity of patients

The severity of anemic status of malaria infected blood samples was classified as mild, moderate and severe anemia according to the criteria of the World Health Organization [27]. Non-anemic condition was defined as hemoglobin level of ≥ 13.0 and ≥ 12.0 mg/dL for males and females, respectively. Mild degree of anemia was defined as hemoglobin levels of 11.0-12.9 and ≥ 11 -11.9 mg/dL for samples collected from males and females, respectively. Moderate and severe anemic conditions in samples from both genders were defined as hemoglobin levels of 8.0-10.9 and < 8.0 g/dL, respectively. Malaria disease severity of all blood samples was classified based on the two laboratory criteria, *i.e.*, anemia (hemoglobin and hematocrit levels) and hyperparasitemia (blood parasitemia count). The risk of patients to develop severe malaria based on analysis of the infected red blood cells was defined as: "high risk" if blood parasitemia was $\geq 100,000/\mu\text{l}$ and/or hemoglobin < 8.0 and/or hematocrit $< 20\%$.

Preparation of genomic DNA

Genomic DNA of all blood samples was prepared using a QIAamp DNA extraction mini-kit (QIAGEN, CA, USA) according to manufacturer's instruction and used as a template for polymerase chain reaction (PCR) amplification.

Analysis of HO-1 polymorphisms

The 5'-flanking region of the HO-1 gene containing the (GT) n repeat was amplified by PCR using the forward primer ACGCCTGGGGTGCATCAAGTC and the reverse primer GTGGGGTGGAGAGGAGCAGTCATA [28]. The gene was amplified in a thermocycler (T100TM Thermal cycler, BioRad) under the following cycling conditions: 5 min denaturation at 94°C followed by 30 cycles of 45 s at 94°C, 30 s at 65°C and 45 s at 94°C at 72°C, and a final extension step at 72°C for 2 min. The PCR products were subjected to high solution electrophoresis and the fragment sizes were compared with (GT) $_{27}$ repeat DNA. The alleles

consisting of less than (GT)27 repeat were classified as S (short) alleles, and those consisting of (GT)27 repeat or longer were classified as L (long) alleles.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package (version 12.0 SPSS Inc., IL, USA). The frequencies of malaria species, ABO blood group, and types of thalassemia are summarized as percentage (%). Levels of parasitemia, hemoglobin, hematocrit, MCV and MCH are summarized as median and range for data not conforming to normal distribution. Differences in qualitative and quantitative data between groups were analyzed using chi-square test and Kruskal-Wallis Test, respectively. Pair-wise comparison of the statistically significant Kruskal-Wallis test was performed using Mann-Whitney test. Statistical significance level was set at $\alpha=0.05$ for all tests.

Results

Of the 100 malaria infected blood samples collected, mono-infection with either *P. falciparum* or *P. vivax* accounted for 35% and 63%, respectively; mixed infection of both species accounted for 2% of the samples. The median (range) of parasitemia in all samples was 4,205 (50-80,300) / μ l, while those with mono-infection with *P. falciparum*, *P. vivax* and mixed infection of both species were 7,764 (355-80,300), 3,618 (50-74,667) and 12,820 (2,920-22,720) / μ l, respectively.

Association between ABO blood group and occurrence of malaria infection and severity

The highest frequency of ABO blood group in the samples was O (37%), followed by B (31%), A (25%), and AB (7%). No significant association between ABO blood group and susceptibility of malaria infection was found (Table 1). The distribution of all types of malaria infections was not significantly different in all blood groups, although proportion of samples with blood group O with *P. vivax* infection was about three times higher than that with *P. falciparum* infection. The association between the ABO blood group and severity of malaria infection was further determined based on parasitemia, and anemic status (hemoglobin and hematocrit levels). Based on these criteria, proportion of patients with high risk of developing severe malaria was significantly higher in blood group A compared with other blood groups ($p = 0.026$) (Table 2).

Association between prevalence of thalassemic variants and occurrence of malaria infection

The prevalence of thalassemia in the samples was 30%. Among six common types, *i.e.*, Hb E, β -thalassemia, α -thalassemia-1, α -thalassemia-2, Hb E/ α -thalassemia-2, and β -thalassemia/ α -thalassemia-2, Hb E and α -thalassemia-2 accounted for the majority of all types (14% and 10%, respectively) (Table 3). Only one sample with α -thalassemia-1 was SEA deletion. All samples with α -thalassemia-2 were 3.7 kb gene deletion.

The association between thalassemia variants and the infected malaria species, parasitemia, hemoglobin, hematocrit, MCV, and MCH were investigated. Results suggested significant effects of these red blood cell parameters of the thalassemia in the malaria infected samples. Significant difference in hematocrit, but not hemoglobin level was found between malaria infected samples without thalassemia and those with all types of thalassemia (Table 3). The MCV of malaria infected samples with HbE, α -thalassemia 2 and β / α -thalassemia 2 were significantly different from those malaria infected samples with or without thalassemia. In addition, the MCH of malaria infected samples with HbE, β -thalassemia and β / α -thalassemia 2 were significantly different from those malaria infected samples with or without thalassemia.

The associations between malaria infected samples with or without thalassemia and anemic status (non-anemia, mild anemia, moderate anemia, and severe anemia) were investigated and results are summarized in Table 4. Significant association between malaria infected samples with and without thalassemia was found. β -thalassemia and Hb E/ α -thalassemia 2 were significantly associated with the anemic status. In malaria infected samples without thalassemia, the proportion of severe anemia was significantly lower than that with thalassemia.

Association between heme oxygenase-1 promotor genotypes and malaria disease severity

The number of (GT)_n repeat of the HO-1 gene in the malaria infected samples ranged from 13 to 39. The size of HO-1 gene was categorized as short (S: 13-26 repeats), and long (L: 27- 39 repeats). The allele frequencies of (GT)_n allele in each sample was further classified into three genotypes, *i.e.*, S/S, S/L, and L/L (Table 5). There was no association between HO-1 promotor genotype and the risk of development of severe malaria.

Relationship between ABO blood group, thalassemia status, HO-1 genotypes and malaria severity

The relationships between the three host genetic factors in malaria infected samples were investigated. Results showed no significant association between ABO blood group and thalassemia type ($p = 0.149$), ABO blood group and HO-1 polymorphisms ($p = 0.890$), as well as thalassemia type and HO-1 polymorphisms ($p = 0.811$).

Discussion and Conclusions

The ABO blood group distribution found in the samples analyzed in the present study was similar to that previously reported in other studies in Thailand [29-31]. The most prevalent blood group was O (37%). The most prevalent blood group in blood samples infected with *P. falciparum* and *P. vivax* were B and O, respectively. It was noted however that the proportion of samples infected with *P. vivax* with blood group O was about three times of *P. falciparum*. This observation may suggest increased susceptibility to *P. vivax* infection compared with *P. falciparum* infection in patients with blood group O. Blood samples with A antigen on red blood cells (blood group A and AB) were not found in samples identified as high risk of developing severe malaria. It is possible that patients with blood group A and AB are more likely protected from severe malaria.

The association between thalassemia and malaria disease was investigated in several studies and the protective effect against *P. falciparum* malaria by different types of thalassemic red cells was demonstrated. These include hemoglobin E [17], α -thalassemia [2, 18], and β -thalassemia [19, 20]. In Southeast Asia, the major type of thalassemia is Hb E [32]. In the present study, the most prevalent thalassemia variants found in 100 malaria infected, both *P. falciparum* and *P. vivax* infected samples, were Hb E and α -thalassemia-2. Different types of thalassemia had different degree of impact on the anemic status of the malaria infected samples. The β -thalassemia and Hb E/ α -thalassemia 2 were significantly associated with severe anemia and the risk to development of severe malaria.

The association between HO-1 promotor genotypes and malaria infection was investigated in various populations. Elevated HO-1 expression was associated with severe malaria in Gambian children [21] and with cerebral malaria in Malawian [22], Burmese [3] and Angolan children [23]. The association between HO-1 polymorphism and malaria disease severity was initially proposed by Shibahara et al. [24, 33]. Later studies provided supporting evidence on the association between (GT)_n repeat polymorphisms of HO-1 and malaria severity in Karen ethnic minority group in Myanmar [3], and Thai, Burmese and Karen patients in

Thailand [4]. The proportion of Karen patients with short (GT)_n alleles was found to be significantly higher in cerebral malaria than uncomplicated malaria [3]. Significant difference in HO-1 genotypes was found among three ethnics patients that may explain difference in pathogenicity/severity of malaria infection in various ethnics. Nevertheless, the relationship between ABO blood group, thalassemia type, HO-1 polymorphisms and malaria disease severity were not found in the present study. This could be explained by the observed low prevalence of S/S genotype and high proportion of samples with *P. vivax* infection with a typical characteristic of low parasitemia compared with *P. falciparum* infection.

In conclusion, malaria infected red blood cells with β -thalassemia and Hb E/ α -thalassemia 2 are more likely to develop severe malaria. Those with blood group A and AB are more likely to protect patients from the risk of developing severe malaria. Further study with increasing sample size should be performed to confirm the impacts of these three host genetic factors, *i.e.*, ABO blood groups, thalassemia types and HO-1 polymorphisms, in malaria patients.

Acknowledgments

The study was supported by The Thailand Research Fund (TRF) Grant for new researcher and Thammasat University (TU) Research Fund contract No. TRG5880215.

References

1. Stevenson M, Riley M. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(3): 169-180.
2. Weatherall J. Thalassaemia and malaria, revisited. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; 91(7): 885-890.
3. Takeda M, Kikuchi M, Ubalee R, Na-Bangchang K, Ruangweerayut R, Shibahara S, Imai S, Hirayama K. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(5): 268-271.
4. Kuesap J, Hirayama K, Kikuchi M, Ruangweerayut R and Na-Bangchang K. Study on association between genetic polymorphisms of haem oxygenase-1, tumour necrosis factor, cadmium exposure and malaria pathogenicity and severity. *Malar J* 2010; 9: 260.
5. Campino S, Kwiatkowski D, Dessein A. Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. *Semin Immunol* 2006; 18: 411-22.
6. Allison AC. Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 1954; 1: 290-294.
7. Martin SK, Miller LH, Hicks CU, David-West A, Ugbo C, Deane M. Frequency of blood group antigens in Nigerian children with falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73(2):216-8.
8. Fischer PR1, Boone P. Short report: severe malaria associated with blood group. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(1): 122-3.
9. Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Bienzle U, Kremsner PG. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 1999; 28(4): 794-9.
10. Tekeste Z1, Petros B. The ABO blood group and Plasmodium falciparum malaria in Awash, Metehara and Ziway areas, Ethiopia. *Malar J* 2010; 9: 280. doi: 10.1186/1475-2875-9-280.
11. Pathirana SL, Alles HK, Bandara S, Phone-Kyaw M, Perera MK, Wickremasinghe AR, Mendis KN, Handunnetti SM. ABO-blood-group types and protection against severe, Plasmodium falciparum malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99(2): 119-24.

12. Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans AM, Lyke KE, Koné A, Diallo DA, Raza A, Kai O, Marsh K, Plowe CV, Doumbo OK, Moulds JM. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(44): 17471-6.
13. Panda AK, Panda SK, Sahu AN, Tripathy R, Ravindran B, Das BK. Association of ABO blood group with severe *falciparum* malaria in adults: case control study and meta-analysis. *Malar J* 2011; 10: 309. doi: 10.1186/1475-2875-10-309.
14. Rout R, Dhangadamajhi G, Ghadei M, Mohapatra N, Kar K, Ranjit M. Blood group phenotypes A and B are risk factors for cerebral malaria in Odisha, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(9): 538-43.
15. Resende SS, Milagres VG, Chaves DG, Fontes CJ, Carvalho LH, Sousa TN, Brito CF. Increased susceptibility of blood type O individuals to develop anemia in *Plasmodium vivax* infection. *Infect Genet Evol* 2017 ;50:87-92.
16. Vento S, Cainelli F, Cesario F. Infections and thalassaemia. *The Lancet Infectious diseases* 2006; 6(4): 226-33.
17. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, White N. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P. falciparum* malaria. *Blood* 2002; 100(4):1172-6.
18. Wambua S, Mwangi TW, Kortok M, Uyoga SM, Macharia AW, Mwacharo JK, Weatherall DJ, Snow RW, Marsh K., Williams TN. The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Med* 2006; 3: 643-651.
19. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, Gilles HM. Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet* 1976; 1, 1269-1272.
20. Pantaleo A, Ferru E, Carta F, Valente E, Pippia P, Turrini F. Effect of heterozygous beta thalassemia on the phosphorylative response to *Plasmodium falciparum* infection. *J Proteomics* 2012;76 Spec No.:251-8.
21. Walther M, De Caul A, Aka P, Njie M, Amambua-Ngwa A, Walther B, Predazzi IM, Cunningham A, Deininger S, Takem EN, Ebonyi A, Weis S, Walton R, Rowland-Jones S, Sirugo G, Williams SM, Conway DJ. HMOX1 Gene Promoter Alleles and High HO-1 Levels Are Associated with Severe Malaria in Gambian Children. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002579.
22. Clark A, Awburn M, Harper G, Liomba G, Molyneux E. Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal *falciparum* malaria and sepsis. *Malar J* 2003; 2: 41.
23. Sambo R, Trovada MJ, Benchimol C, Quinhentos V, Gonçalves L, Velosa R, Marques MI, Sepúlveda N, Clark TG, Mustafa S, Wagner O, Coutinho A, Penha-Gonçalves C. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PLoS One* 2010; 5:e11141.
24. Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2003, 200: 167-86.
25. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia and abnormal haemoglobin. *Int J Hematol* 2002;76(suppl 2):83-9.
26. Nagel RL, Raventos-Suarez C, Febby ME, Tonowitz H, Sicard D, Labie D. Impairment of the growth of *P. falciparum* in HbEE erythrocytes. *J Clin Invest* 1981;68:303-305.

- 368 27. World Health Organization, 2011. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia
369 and assessment of severity. World Health Organization, Geneva.
- 370 28. Fu WP, Zhao ZH, Fang LZ, Sun C, Liu L, Zhang JQ, Zhang YP, Dai LM. Heme oxygenase-
371 1 polymorphism associated with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Chin*
372 *Med J (Engl)* 2007; 120(1): 12-6.
- 373 29. Chandanayingyong D, Sasaki T, and Greenwalt T. Blood groups of the Thais. *Transfusion*
374 1967; 7(4): 269–276.
- 375 30. Nathalang O, Kuvanont S, Punyaprasiddhi P, Tasaniyanonda C, and Sriphaisal T. A
376 preliminary study of the distribution of blood group systems in Thai blood donors determined
377 by the gel test. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32 (1): 204–207.
- 378 31. Palacajornsuk P, Somsak P. Screening of ABO, Rh typing and unexpected alloantibodies in
379 pregnant women attending antenatal care at Sriphat Medical Center, Faculty of Medicine,
380 Chiang Mai University. *Journal of Associated Medical Sciences* 2017; 50 (2): 153-158.
- 381 32. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin* 1987; 11:
382 65-88.
- 383 33. Shibahara S, Kitamuro T, Takahashi K. Heme degradation and human disease: diversity is
384 the soul of life. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 593–602.

Table 1. The distribution of ABO group and malaria species infected in 100 blood samples. Data are summarized as percentage (n=100).

<i>Plasmodium</i> species	O	A	B	AB	Total
<i>P. falciparum</i>	9	11	12	3	35
<i>P. vivax</i>	27	13	19	4	63
Mixed infection of <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	1	1	0	0	2

For Peer Review

Table 2 The distribution of ABO blood group and risk of developing severe malaria based on parasitemia and the anemic status of patients (levels of hemoglobin and hematocrit). Data are presented as median (range) values or percentage values.

Variables	Distribution in ABO group			
	O	A	B	AB
Parasitemia (median and range, μ l blood):				
<i>P. falciparum</i>	15,776 (461-80,300)	7,200 (800-41,429)	9,703 (355-70,095)	1,608 (1,600-2,300)
<i>P. vivax</i>	4,705 (64-74,667)	3,909 (50-12,000)	2,583 (150-42,988)	12,075 (1,563-12,808)
Mixed infection of <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	2,920 (2,920- 2,920)	22,720 (22,720- 22,720)	-	-
Hemoglobin (%):				
Non-anemia (male $\geq$ 13, female $\geq$ 12 g/dL)	14	13	15	4
Mild anemia (male 11-12.9, female 11- 11.9 g/dL)	13	8	8	0
Moderate anemia (8.0-10.9 g/dL for both genders)	6	5	3	2
Severe anemia (<8.0 g/dL for both genders)	4	0	5	0
Hematocrit (%):				
$\geq$ 20%	37	26	28	6
< 20%	0	0	3	0
Risk of developing severe malaria (%):				
Low risk	30	25	25	7
High risk (parasitemia $\geq$ 70,000 μ l) and/or hemoglobin (<8.0) and/or hematocrit < 20%	7	0 ^a	6	0

^a Statistically significant difference from patient with other blood groups ($p = 0.026$)

Table 3 The prevalence of thalassemia in 100 malaria infected samples. The hematological parameters are presented as median (range) values.

Thalassemia	Number (%)	Malaria Type			Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)
		PF	PV	Mixed				
Malaria with thalassemia:	30	9	20	1	11.5 (5.1-14.3)	34.3 (15.9-44.1)	71.0 (53.0-91.0)	23.2 (15.2-30.2)
Hb E	14	3	10	1	11.8 (7.8-14.3)	35.5 (21.9-43.0)	73.5 (63.0-83.0) ^b	24.1 (20.5-27.4) ^f
β-thalassemia	1	1	0	0	6.0 (6.0-6.0)	18.0 (18.0-18.0)	58.0 (58.0-58.0)	18.7 (18.7-18.7) ^g
α-thalassemia 1	1	1	0	0	12.7 (12.7-12.7)	41.3 (41.3-41.3)	68.7 (68.7-68.7)	21.2 (21.2-21.2)
α-thalassemia 2	10	3	7	0	12.0 (5.1-14.3)	35.5 (15.9-44.1)	73.5 (53.0-91.0) ^c	23.8 (15.2-30.2)
Hb E/α-thalassemia 2	1	0	1	0	7.6 (7.6-7.6)	24.0 (24.0-24.0)	62.0 (62.0-62.0)	19.7 (19.7-19.7)
β/α-thalassemia 2	3	1	2	0	10.9 (9.8-11.1)	33.6 (28.3-34.3)	67.0 (60.0-67.0) ^d	21.3 (19.6-22.7) ^h
Malaria without thalassemia:	70	26	43	1	12.4 (3.4-17.7)	37.7 (10.7-55.1) ^a	84.5 (50.0-101.0) ^e	27.80 (20.8-32.3) ⁱ

PF = *P. falciparum*, PV = *P. vivax*, Hb = hemoglobin, Hct = hematocrit, MCV = mean corpuscular volume (MCV), MCH = mean corpuscular hemoglobin

^aStatistically significant difference from samples with thalassemia ($p=0.006$)

^bStatistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.002$)

^cStatistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.045$)

^dStatistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.007$)

^eStatistically significant difference from samples with thalassemia ($p<0.001$)

^fStatistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.001$)

^gStatistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.043$)

^hStatistically significant difference from samples with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.006$) ^jStatistically significant difference from patients with thalassemia ($p<0.001$)

Table 4 The association of thalassemia and anemic status in malaria infected samples. Data are presented as percentage (%) values.

Thalassemia	Anemic status			
	Non-anemia	Mild anemia	Moderate anemia	Severe anemia
Malaria with thalassemia ^a :	10	7	7	6
Hb E	6	2	4	2
β -thalassemia ^b	0	0	0	1
α -thalassemia 1	0	1	0	0
α -thalassemia 2	4	3	1	2
Hb E/ α -thalassemia 2 ^c	0	0	0	1
β/α -thalassemia 2	0	1	2	0
Malaria without thalassemia:	36	20	11	3 ^d

^a Statistically significant difference from patients with thalassemia ($p=0.016$)

^b Statistically significant difference from patients with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.023$)

^c Statistically significant difference from patients with other types of thalassemia and without thalassemia ($p=0.023$)

^d Statistically significant difference from patients with other types of thalassemia ($p=0.019$)

Table 5 Distribution of HO-1 promoter genotypes (S and L) including allele (S/S, S/L, and L/L) frequencies and malaria severity in 100 malaria infected samples. Data are presented as percentage (%) values.

	Number	Malaria species			Malaria Severity	
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Mixed infection	UM	RSM
Alleles, n (%)						
S	112 (56)					
L	88 (44)					
Genotypes, (%)						
S/S	25	8	16	1	22	3
S/L	62	25	37	0	53	9
L/L	13	2	10	1	12	1

UM = uncomplicated malaria, RSM = risk to severe malaria

Research Training 2018

Pharmacology and Toxicology Laboratory
for

Student from University of Santo Tomas, Philippines

Heme oxygenase-1 polymorphism in malaria patients in Thailand

Date	Activities	Responsibility
Tue 16Jan18	Visit lab.	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha
Wed 17Jan18	Literature review	Asst. Prof. Dr.Jiraporn
Thu 18Jan18	Reagent preparation DNA extraction	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Mon 22Jan18	PCR Gel electrophoresis	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Tue 23Jan18	PCR Gel electrophoresis	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Wed 24Jan18	PCR Gel electrophoresis	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Thu 25Jan18	PCR Gel electrophoresis	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Fri 26Jan18	PCR Gel electrophoresis	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Mon 29Jan18	Results discussion	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Tue 30Jan18	Results discussion and oral presentation preparation	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Thu 1Feb18	Results discussion and oral presentation preparation	Asst. Prof. Dr.Jiraporn Ms.Natnicha Ms. Phattharaphon
Fri 2Feb18	Oral presentation and send research report to PI	PI and academic team

.....
Student

.....
Asst. Prof. Dr.Jiraporn Kuesap
PI