วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 22 ฉบับที่ 6 พฤศจิกายน - ธันวาคม 2556

Journal of Health Science
Vol. 22 No. 6 November - December 2013

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

คุณสมบัติของฮีโมโกลบินผิดปกติจากการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

อารีรัตน์ ขอไชย วท.บ., วท.ม.*
สาวิตรี ด้วงเรือง วท.บ.*
อัจฉราพร ดำบัว วท.บ.*
พัชราภรณ์ บุญชู วท.บ.*
สิริภากร แสงกิจพร วท.บ., วท.ม.*
ชลลดา ยอดทัพ วท.บ.*
อภิชาติ โชติชูศรี วท.บ.*
สมชาย แสงกิจพร พ.บ., ปร.ด.**

* ศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
** *สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

บทคัดย่อ ฮีโมโกลบินผิดปกติเกิดจากความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบินที่มีโครงสร้างหรือชนิดของกรดอะมิโนผิดปกติไป ผู้วิจัยได้ศึกษาคุณสมบัติเฉพาะ (Retention time - RT) ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติหลักการ HPLC และ LPLC ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการตรวจยืนยันโดยเทคนิค DNA Sequencing ผลการศึกษาพบฮีโมโกลบินผิดปกติ 23 ชนิด มีสาเหตุจากความผิดปกติของ α-Globin Gene 9 ชนิด คือ Hb I, Hb J-Norfolk, Hb Q-Thailand, Hb Grey Lynn, Hb O-Indonesia, Hb Westmead, Hb Quong Sze, Hb Pakse และ Hb CS ส่วนที่เกิดจากความผิดปกติของ β-Globin Gene มี 14 ชนิด คือ Hb C, Hb G-Makassar, Hb S, Hb Malay, Hb E, Hb J-Bangkok, Hb J-Kaohsiung, Hb Korle Bu, Hb Pyrgos, Hb D Los Angeles, Hb Tende, Hb Dhonburi, Hb Hope และ Hb Tak ผลการตรวจ Hb typing โดยเครื่องอัตโนมัติ หลักการ HPLC และ LPLC พบฮีโมโกลบินผิดปกติที่มี RT ตั้งแต่ 1.41-5.14 นาที และ 71-367 วินาที ตามลำดับ การแยกฮีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้ทั้งโดยวิธี HPLC และ LPLC มีลำดับก่อน-หลังคล้ายคลึงกัน และพบฮีโมโกลบินผิดปกติ 3 กลุ่มที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ทำให้ผลจากการตรวจ Hb typing ไม่สามารถแยกชนิดได้ โดยกลุ่มที่ 1 พบบริเวณ S-window ได้แก่ Hb S, Hb Q-Thailand และ Hb G Makassar กลุ่มที่ 2 พบบริเวณ D-window ได้แก่ Hb D Los Angeles, Hb Tak และ Hb Korle Bu และกลุ่มที่ 3 พบบริเวณ Hb A ได้แก่ Hb Dhonburi, Hb Malay, Hb Quong Sze และ Hb Westmead ดังนั้นห้องปฏิบัติการไม่ควรรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยเหล่านี้จากผลการตรวจ Hb typing เพียงอย่างเดียวควรรายงานเพียงว่าพบ Abnormal Hb หากต้องการทราบชนิดที่ถูกต้องจะต้องส่งตรวจยืนยันโดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมหรือลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่อไป

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินผิดปกติ, การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน, ชนิดฮีโมโกลบิน, ปริมาณฮีโมโกลบิน

บทนำ

ฮีโมโกลบินเป็นส่วนประกอบสำคัญที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่นำออกซิเจนไปยังเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายโกลบิน 4 สาย จับกับฮีม 4 อณู โดยสายโกลบิน 4 สาย เกิดจากการรวมตัวกันของสายโกลบิน 2 กลุ่ม คือ สายโกลบินกลุ่ม α ได้แก่ สายโกลบินชนิด α และ ζ ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 141 ตัว โดยมียีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินกลุ่ม α อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 และสายโกลบินกลุ่ม β ได้แก่ สายโกลบินชนิด ε, γ, β และ δ ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 146 ตัว โดยมียีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินกลุ่ม β อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 การสร้างฮีโมโกลบินสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะตัวอ่อน มาเป็นทารกในครรภ์ และระยะหลังคลอด ในคนปกติที่มีอายุมากกว่า 1 ปี พบฮีโมโกลบินที่สำคัญ 3 ชนิด คือ Hb A ($\alpha_2\beta_2$) ประมาณร้อยละ 97, Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) ประมาณร้อยละ 2.5 และ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) น้อยกว่าร้อยละ 1[1]

ฮีโมโกลบินผิดปกติ เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบิน ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สายโกลบินที่มี

โครงสร้างหรือชนิดของกรดอะมิโนผิดปกติไป โดยความผิดปกติสามารถเกิดได้บนสายโกลบินทั้งกลุ่ม α และกลุ่ม β ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการเกิด point mutation ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติหลายร้อยชนิดทั่วโลก[2] บางชนิดไม่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติใด ๆ บางชนิดส่งผลให้มีการสร้างสายโกลบินลดลง คือ มีผลแบบธาลัสซีเมีย ทำให้มีอาการเลือดจางได้ ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประชากรไทยมี 2 ชนิด คือ Hb E พบประมาณร้อยละ 13 ในคนอีสานพบร้อยละ 30-40 มีผลเหมือน β^{+}-thalassemia และ Hb Constant Spring (Hb CS) พบประมาณร้อยละ 1-8 มีผลเหมือน α-thalassemia 2[3,4]

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินนิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติ เนื่องจากขั้นตอนการปฏิบัติงานไม่ยุ่งยากและทราบผลในระยะเวลาอันรวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ปัจจุบันเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินที่ใช้ในประเทศไทยมี 2 หลักการ คือ หลักการคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) อาศัยแรงดันในการชะฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆออกจากคอลัมน์ ซึ่งมีทั้งประเภทแรงดันสูง (HPLC) และประเภทแรงดันต่ำ (LPLC) และหลักการแยกฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก (capillary electrophoresis) การรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อย ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลได้โดยตรงจากการตรวจ Hb typing แต่ยังมีฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิดที่พบได้ไม่บ่อย และก่อให้เกิดปัญหาในการรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากฮีโมโกลบินหลายชนิดมีการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ในเวลาพร้อมกันหรือใกล้เคียงกันจากการทำ Hb typing[5] คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะ (Retention time) ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติหลักการ HPLC และ LPLC และตรวจยืนยันชนิดของฮีโมโกลบินโดยเทคนิค DNA sequencing ผลการศึกษาวิจัยที่ได้เป็นประโยชน์ต่อการสนับสนุนการดำเนินโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศ

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง EDTA Blood ของสามีภรรยาที่เข้าร่วมโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย จำนวน 587 ตัวอย่าง ที่ได้รับจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 13 แห่งทั่วประเทศ ได้แก่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ เชียงราย พิษณุโลก นครสวรรค์ อุดรธานี ขอนแก่น นครราชสีมา อุบลราชธานี สมุทรสงคราม ชลบุรี สุราษฎร์ธานี สงขลา และตรัง

ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน และเตรียม DNA โดยน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Germany) ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของ DNA ที่สามารถจับกับ Silica membrane จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมโดยเทคนิค DNA sequencing เพื่อตรวจยืนยันชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ

เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

- เครื่อง HPLC รุ่น Variant Hemoglobin Testing System (Bio-Rad Laboratories, USA)
- เครื่อง LPLC รุ่น HbGold Analyzer (Drew Scientific, UK)

2. เครื่องตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม รุ่น 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)

รายละเอียดการศึกษา

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 13 แห่งส่งตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติจากการทำ Hb typing พร้อมโครมาโตแกรมการตรวจ Hb typing ไปยังศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์เพื่อตรวจยืนยันชนิดของฮีโมโกลบินโดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม โดยศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์จะทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินซ้ำอีกครั้ง กรณีผล Hb typing สอดคล้องกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์จะทำ DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์หาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ แต่หากผล Hb typing ขัดแย้งกัน ศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์จะปฏิเสธการทำ DNA sequencing

1. การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน โดยวิธี HPLC และ LPLC

อาศัยหลักการเดียวกัน คือ Cation exchange liquid chromatography โดยการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างอิออนของฮีโมโกลบินซึ่งเป็นประจุบวก กับอิออนบนซิลิก้าเจลในคอลัมน์ซึ่งเป็นประจุลบ จากนั้นฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความแรงของประจุ (Ionic strength) สูงกว่า แต่เนื่องจากตัวอย่างเลือดมีฮีโมโกลบินหลายชนิดปนกัน แต่ละชนิดมี Ionic strength ไม่เท่ากัน จึงต้องมีการผสมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่มี Ionic strength แตกต่างกัน ให้มีการเปลี่ยนแปลง Ionic strength ที่เหมาะสำหรับการชะฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ดังนั้นฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ที่ระยะเวลาที่แน่นอนที่แตกต่างกัน (Retention time) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของฮีโมโกลบิน

แต่ละชนิด ส่วนการวัดปริมาณของฮีโมโกลบินทำโดยการวัดการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่ความยาวคลื่น 415 nm และคำนวณหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดออกมาเป็นร้อยละโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟ ข้อมูลทั้งหมดจะถูกส่งไปยังเครื่องประมวลผล และรายงานออกมาเป็นโครมาโตแกรม ทั้งนี้เครื่อง HPLC และ LPLC ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ[6, 7]

2. การวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมโดยเทคนิค DNA Sequencing

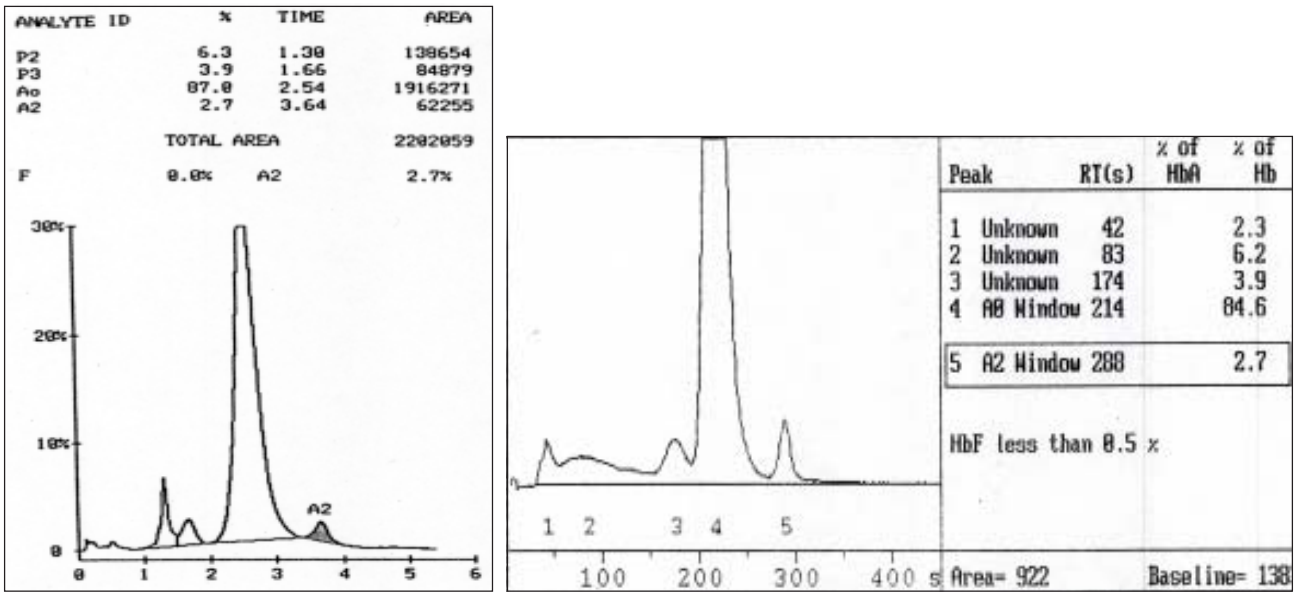
ตรวจยืนยันชนิดของฮีโมโกลบิน โดยเทคนิค DNA sequencing อาศัยหลักการของ Sanger และคณะ[8] ที่เรียกว่า Chain termination โดยนำ DNA ที่ต้องการศึกษามาทำ PCR จากนั้นทำการสร้าง DNA สายใหม่ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase DNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นจะถูกจำกัดความยาวด้วย dideoxy nucleotide ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ตัว (ddATP, ddGTP, ddCTP และ ddTTP) โดยอาศัย BigDye Terminator ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติเป็น Fluorescence dye จับกับ dideoxy nucleotide แต่ละตัว และเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน[9] ทำการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติ ABI 3130 ซึ่งมี Lasor scanning และ Detector เป็นตัวอ่านและแปลผลข้อมูล โดยข้อมูลทั้งหมดจะถูกส่งไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งมีโปรแกรมสำเร็จรูปในการอ่านและวิเคราะห์ผล

ผลการศึกษา

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างสามีภรรยาที่เข้าร่วมโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย พบ Hb F, Hb A และ Hb A_2 ในคนปกติ (ภาพที่ 1) และพบฮีโมโกลบินผิดปกติจากการตรวจโดยเครื่องอัตโนมัติหลักการ HPLC และ LPLC ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการตรวจยืนยันโดยเทคนิค DNA sequencing พบฮีโมโกลบินผิดปกติ 23 ชนิด แต่ละชนิดมีตำแหน่งและชนิดกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน เป็นความผิดปกติที่พบบนสายโกลบินชนิด α 9 ชนิด ได้แก่ Hb I, Hb J-Norfolk, Hb Q-Thailand, Hb Grey Lynn, Hb O-Indonesia, Hb Westmead, Hb Quong Sze, Hb Pakse และ Hb CS เป็นความผิดปกติที่พบบนสายโกลบินชนิด β 14 ชนิด ได้แก่ Hb C, Hb G-Makassar, Hb S, Hb Malay, Hb E, Hb J-Bangkok, Hb J-Kaohsiung, Hb Korle Bu, Hb Pyrgos, Hb D Los Angeles, Hb Tende, Hb Dhonburi, Hb Hope และ Hb Tak (ดังสรุปในตารางที่ 1)

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และ LPLC จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน มี RT ตั้งแต่ 1.41-5.14 นาที และ 71-367 วินาที ตามลำดับ (ตารางที่ 1) พบฮีโมโกลบินผิดปกติ 3 กลุ่มที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ทำให้ผลจากการตรวจ Hb typing ไม่สามารถแยกชนิดได้ โดยกลุ่มที่ 1 พบบริเวณ S-window ได้แก่

ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของคนปกติที่ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC (ก) และวิธี LPLC (ข)



(ก) (ข)

Hb S, Hb Q-Thailand และ Hb G Makassar เครื่องจะรายงานฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 3 ชนิดนี้เป็น Hb S (ภาพที่ 2) กลุ่มที่ 2 พบบริเวณ D-window ได้แก่ Hb D Los Angeles, Hb Tak และ Hb Korle Bu (ภาพที่ 3) เครื่องจะรายงานฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 3 ชนิดนี้เป็น Hb D และกลุ่มที่ 3 พบบริเวณ Hb A ได้แก่ Hb Dhonburi, Hb Malay, Hb Quong Sze และ Hb Westmead เครื่องจะรายงานฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 3 ชนิดนี้เป็น Hb A (ภาพที่ 4)

ผลการศึกษาพบ Hb E มากที่สุด (ร้อยละ 51 ของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบ) และ Hb CS รองลงมา (ร้อยละ 13.4 ของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบ) โดยพบกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ สำหรับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นๆ มีความถี่ในการตรวจพบแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค โดยภาคใต้ถือเป็นภูมิภาคที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด พบฮีโมโกลบินผิดปกติ 16 ชนิด จาก 23 ชนิด (ดังสรุปในภาพที่ 5)

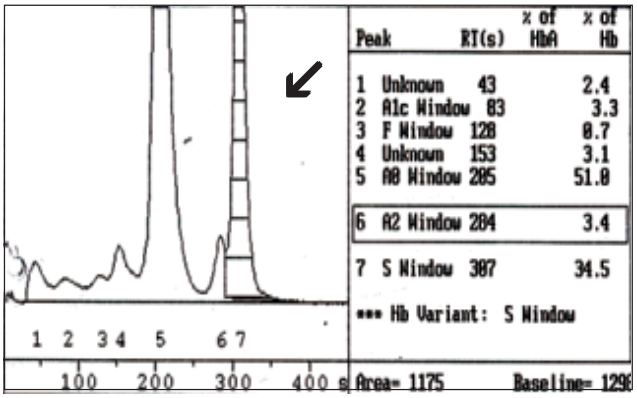
วิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยเครื่องอัตโนมัติหลักการ HPLC และ LPLC ทำให้ทราบคุณสมบัติของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน การแยกฮีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้ทั้งโดยวิธี HPLC และ LPLC มีลำดับก่อน-หลังคล้ายคลึงกัน

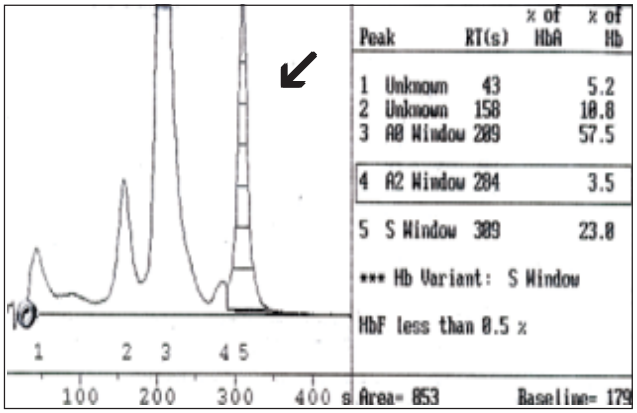
ตารางที่ 1 แสดงลำดับและชนิดของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปบนสายโกลบินของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ และคุณสมบัติเฉพาะ (Retention time) ของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC และ LPLC

ชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ	ความผิดปกติของยีน	เครื่อง HPLC		เครื่อง LPLC	
		จำนวน (ราย)	RT (Mean ± 2SD)	จำนวน (ราย)	RT (Mean ± 2SD)
α-globin gene					
Hb I	α16: AAG→GAG	-	-	1	71
Hb J-Norfolk	α57: GGC→GAC	1	1.62	1	152
Hb Q-Thailand	α74: GAC→CAC	10	4.62 ± 0.08	29	312 ± 6.34
Hb Grey Lynn	α91: CTT→TTT	1	3.92	1	294
Hb O-Indonesia	α116: GAG→AAG	1	4.9	-	-
Hb Westmead	α122: CAC→CAG	-	-	1	207
Hb Quong Sze	α125: CTG→CCG	2	2.41 ± 0.04	2	205 ± 1.42
Hb Pakse	α142: TAA→TAT	2	5.02 ± 0.02	2	315 ± 1.42
Hb CS	α142: TAA→CAA	84	5.01 ± 0.08	120	313 ± 10.62
β-globin gene					
Hb C	β6: GAG→AAG	42	5.14 ± 0.04	35	367 ± 8.22
Hb G-Makassar	β6: GAG→GCG	4	4.46 ± 0.04	4	309 ± 1.00
Hb S	β6: GAG→GTG	1	4.44	2	305 ± 5.66
Hb Malay	β19: AAC→AGC	32	2.58 ± 0.08	28	212 ± 10.12
Hb E	β26: GAG→AAG	214	3.69 ± 0.08	243	271 ± 14.10
Hb J-Bangkok	β56: GGC→GAC	1	2.08	5	181 ± 15.11
Hb J-Kaohsiung	β59: AAG→ACG	-	-	1	181
Hb Korle Bu	β73: GAT→AAT	2	3.96 ± 0.08	3	287 ± 7.58
Hb Pyrgos	β83: GGC→GAC	4	1.42 ± 0.06	4	99 ± 9.14
Hb D Los Angeles	β121: GAA→CAA	6	4.07 ± 0.06	2	286 ± 1.42
Hb Tende	β124: CCA→CTA	2	2.26 ± 0.06	1	195
Hb Dhonburi	β126: GTG→GGG	3	2.61 ± 0.12	6	211 ± 10.98
Hb Hope	β136: GGT→GAT	38	1.41 ± 0.08	26	127 ± 13.92
Hb Tak	β147: +AC	14	4.18 ± 0.20	24	289 ± 8.74

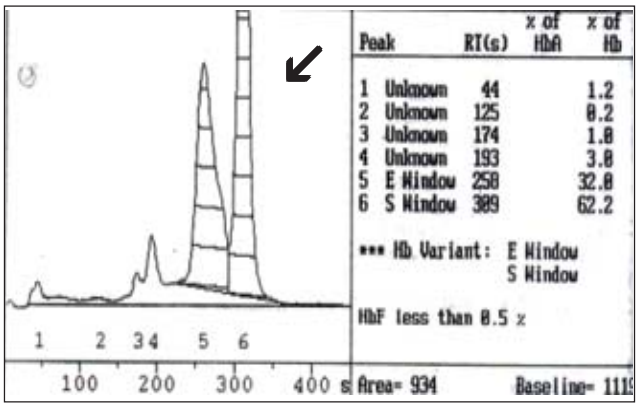
ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบริเวณ S-window ประกอบด้วย Hb S: RT 307 วินาที (ก), Hb Q-Thailand: RT 309 วินาที (ข) และ Hb G Makassar: RT 309 วินาที (ค) จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี LPLC



(ก)

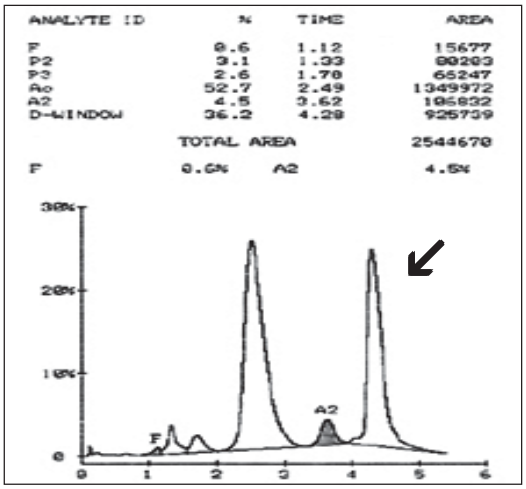


(ข)

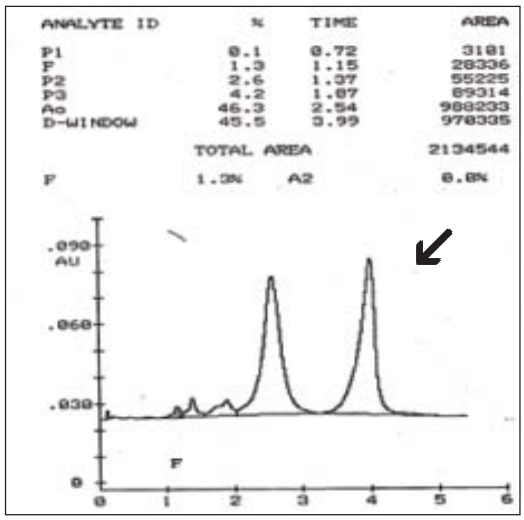


(ค)

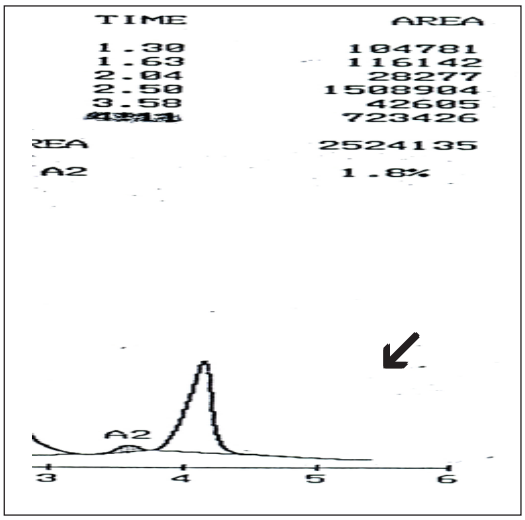
ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบริเวณ D-window ประกอบด้วย Hb Tak: RT 4.28 นาที (ก), Hb Korle Bu: RT 3.99 นาที (ข) และ Hb D Los Angeles: RT 4.04 นาที (ค) จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี HPLC



(ก)

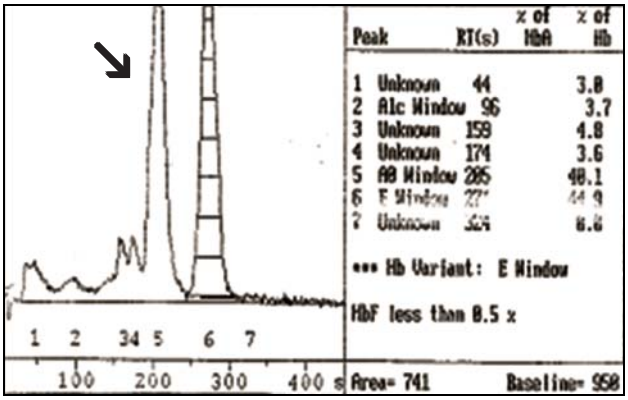


(ข)

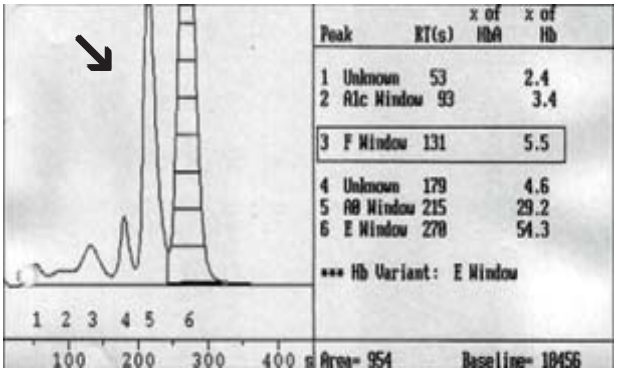


(ค)

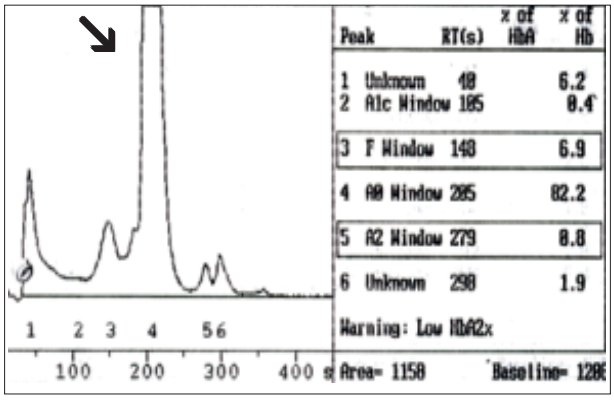
ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบริเวณ Hb A ประกอบด้วย Hb Dhonburi:RT 205 วินาที (ก), Hb Malay: RT 215 วินาที (ข), และ Hb Quong Sze: RT 205 วินาที (ค) และ Hb Westmead: RT 207 วินาที (ง) จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี LPLC



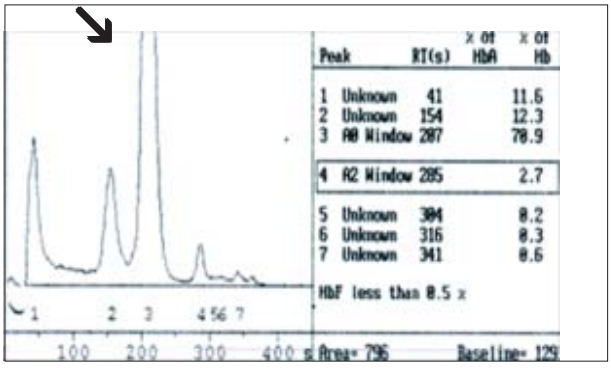
(ก)



(ข)

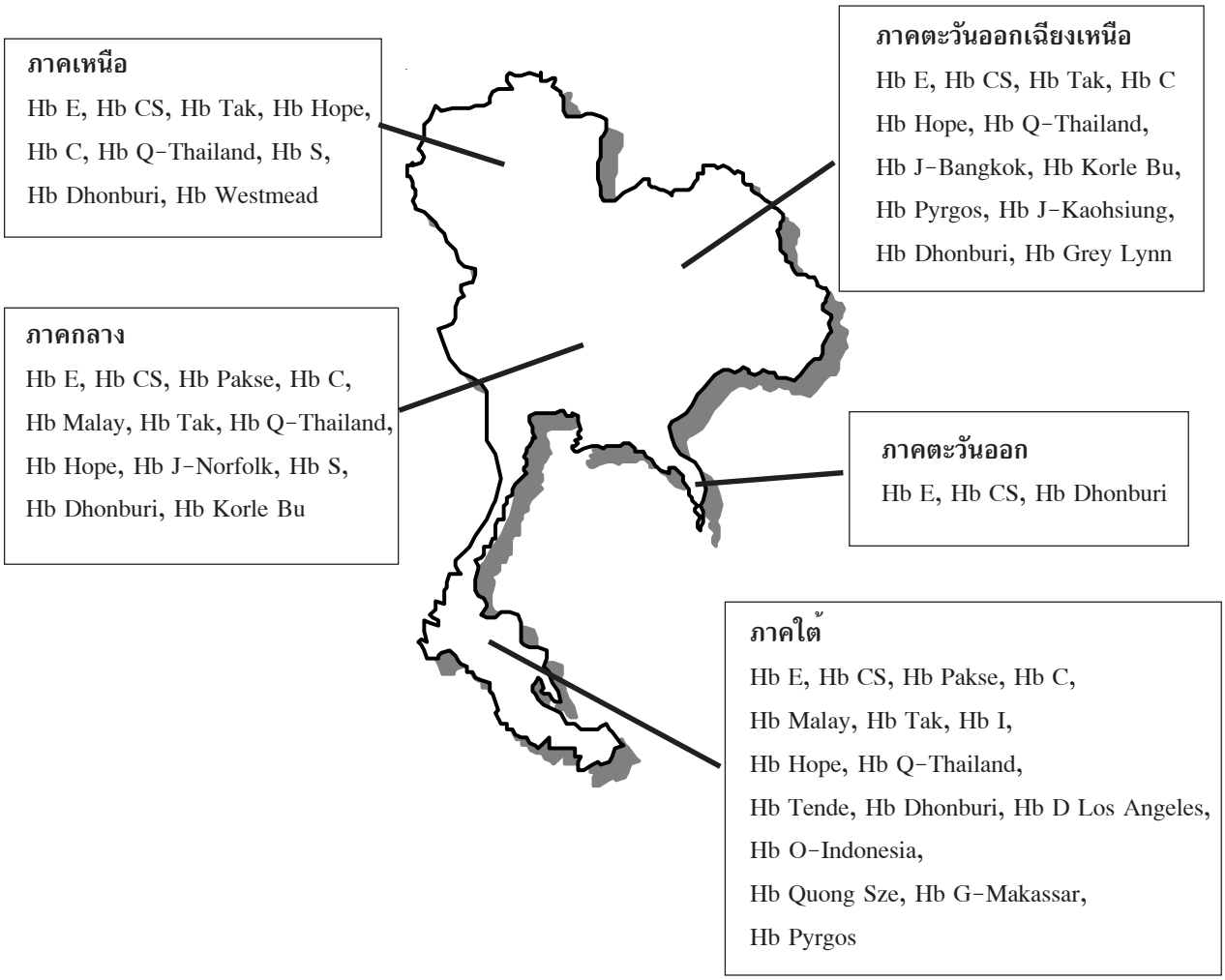


(ค)



(ง)

ภาพที่ 5 ความหลากหลายของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆ ที่พบในแต่ละภูมิภาคของประเทศ

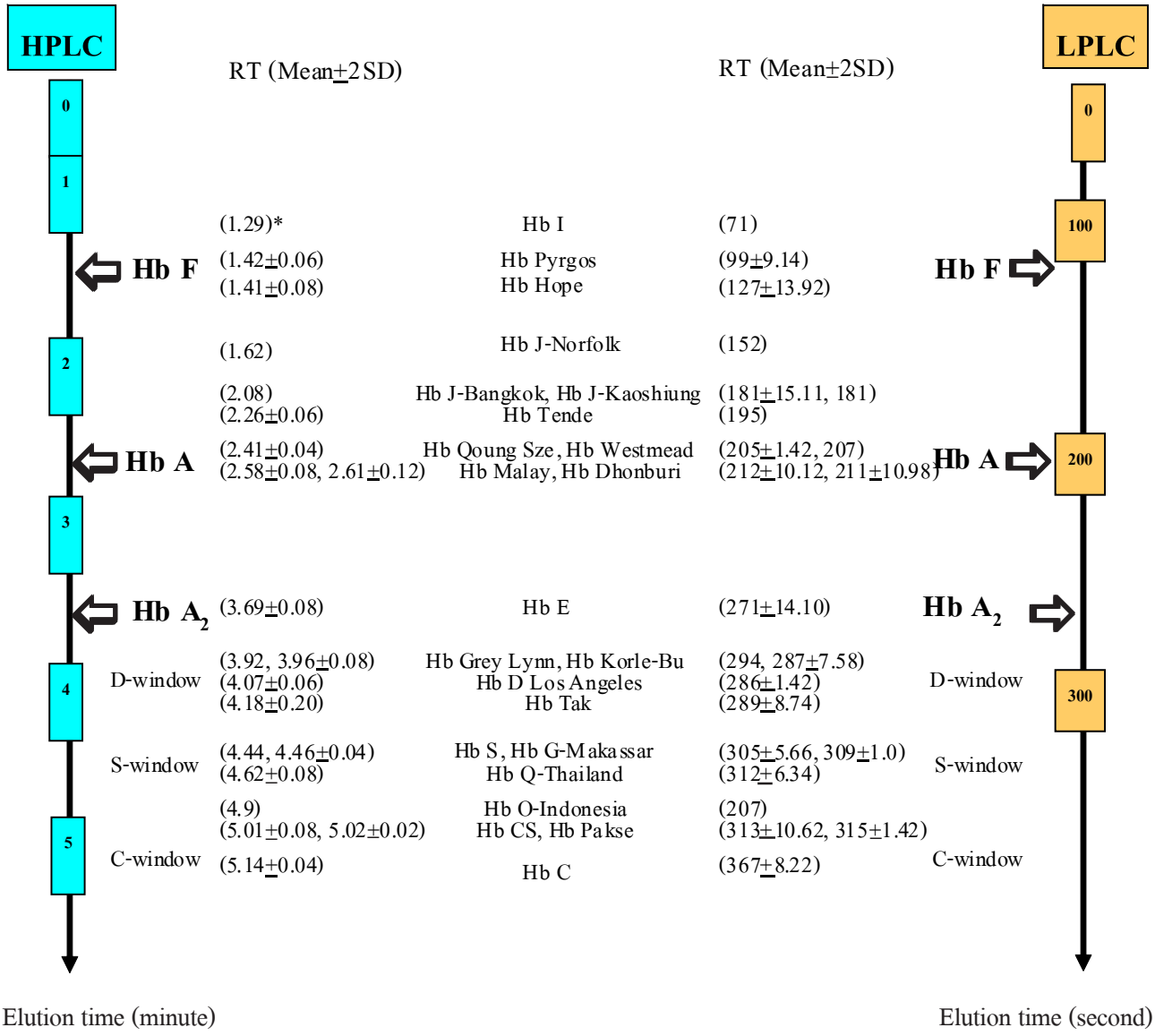


เมื่อเปรียบเทียบกับ Hb F, Hb A และ Hb A_2 ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินที่พบในคนปกติ ผลการศึกษาพบว่า Hb I ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นลำดับแรก และ Hb C ถูกชะจากคอลัมน์เป็นลำดับสุดท้าย (ดังสรุปในภาพที่ 6)

จากภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าฮีโมโกลบินหลายชนิดมีค่า RT ที่ใกล้เคียงกัน ไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากกันได้จากการตรวจ Hb typing การส่งตรวจยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม จะทำให้ทราบชนิดที่ถูกต้องของฮีโมโกลบิน แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมมีค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งมีกระบวนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่การสกัด DNA การเตรียม DNA template การทำ DNA sequencing และการแปลผล ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ ก่อนเริ่มกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม ตัวอย่างทุกรายจะได้รับการตรวจ Hb typing ซ้ำอีกครั้ง และตรวจสอบความสอดคล้องกับผล Hb typing ที่วิเคราะห์โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นตัวอย่างเดียวกันกับตัวอย่างที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ต้องการส่งตรวจยืนยันชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ และผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม จะต้องเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับผล Hb typing เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีการสลับตัวอย่างในกระบวนการทำ DNA sequencing อาทิเช่น ผล Hb typing พบฮีโมโกลบินผิดปกติบริเวณ D-window ผลการวิเคราะห์ DNA อาจเป็นได้ทั้ง Hb D Los Angeles, Hb Tak หรือ Hb Korle Bu

ผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีความผิดปกติทั้งสายโกลบินชนิด α และ β โดยความผิดปกติตำแหน่งเดียวกันเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนต่างชนิดกัน ก็ทำให้เกิดฮีโมโกลบินผิดปกติต่างชนิดกัน เช่น ความผิดปกติที่เกิดบนสาย α ตำแหน่งที่ 142 อาจเป็นได้ทั้ง Hb Pakse, Hb CS หรือ ความผิดปกติ

ภาพที่ 6 แสดงลำดับก่อน-หลังของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยเครื่อง HPLC และ LPLC



หมายเหตุ: * ข้อมูลอ้างอิงจาก Torres FR, et al. Genet Mol Res 2006;5:713-6[10]

ที่เกิดบนสาย β ตำแหน่งที่ 6 อาจเป็นได้ทั้ง Hb C, Hb G-Makassar, Hb S (ดังสรุปในตารางที่ 1)

Hb E และ Hb CS เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในทุกภูมิภาคของประเทศ การเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่าง Hb E กับยีนธาลัสซีเมียจะทำให้เกิดความผิดปกติในระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของยีนธาลัสซีเมีย ถ้าเป็นมิวเตชั่นชนิดที่เป็น β^{+}-thalassemia เช่น -28, codon 19, IVS1 nt 5, IVS2 nt 654 ความรุนแรงจะน้อยกว่า มิวเตชั่นชนิด ที่เป็น β^{0}-thalassemia เช่น codon 17, codon 41-42, codon 71-72, IVS1 nt 1[11] ในทางปฏิบัติหากผลการตรวจ Hb typing พบ Hb E ชัดเจนสามารถรายงานผลได้ กรณี Hb E มีปริมาณร้อยละ 10-20, ร้อยละ 35-80 หรือมากกว่าร้อยละ 80 ร่วมกับมี Hb F สูงมากกว่าร้อยละ 10 จำเป็น ต้องตรวจยืนยันในระดับยีนเพื่อวินิจฉัยแยกระหว่าง Hb E กับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นที่พบบริเวณเดียวกัน สำหรับ Hb CS เนื่องจากเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่คงทนและสูญสลายได้ง่าย จึงเป็นอุปสรรคในการรายงานผล หากผลการตรวจ Hb typing ไม่ชัดเจนจำเป็นต้องตรวจยืนยันในระดับยีนเช่นกัน นอกจากการตรวจโดยเทคนิค DNA sequencing แล้ว[12] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ได้พัฒนาเทคนิค Allelic

Discrimination อาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย Hb E และ Hb CS ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ใช้เวลารวดเร็ว และราคาไม่แพง[13,14] โดยถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจให้กับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 13 แห่งทั่วประเทศตั้งแต่ปี 2549 นับเป็นการพัฒนาศักยภาพการตรวจทางห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากผลการศึกษาพบว่า นอกจาก Hb E และ Hb CS ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในงานประจำวันแล้ว ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยอีกหลายชนิด โดยพบ Hb C มากที่สุด และพบ Hb Hope และ Hb Malay รองลงมาตามลำดับ ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบมีทั้งชนิดที่จัดเป็นธาลัสซีเมียและชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ฮีโมโกลบินผิดปกติที่จัดเป็นธาลัสซีเมีย เช่น Hb E, Hb CS, Hb Q-Thailand, Hb Malay, Hb Dhonburi และแม้ว่าฮีโมโกลบินผิดปกติหลายชนิด เช่น Hb G-Makassar, Hb Hope, Hb J-Bangkok จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ผลการตรวจวินิจฉัยก็มีความสำคัญในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม[5] ดังนั้นการวินิจฉัยในระดับยีนเพื่อแยกชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติ จึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยในงานประจำวัน สำหรับฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มที่ปรากฏบริเวณ Hb A ตำแหน่งของ peak ใกล้เคียงกันมากกับ Hb A ทำให้มีโอกาสวินิจฉัยผิดพลาดได้ การพิจารณาข้อมูลพารามิเตอร์ต่าง ๆของเม็ดเลือดแดงร่วมด้วย จะช่วยให้ห้องปฏิบัติการรายงานผลการตรวจวินิจฉัยได้ถูกต้อง

ปัจจุบันฮีโมโกลบินผิดปกติถูกพบมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากประชาชนตระหนักถึงความสำคัญของโรคธาลัสซีเมียและเข้าร่วมโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ในทางปฏิบัติหากพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยจากการตรวจ Hb typing ห้องปฏิบัติการไม่ควรระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติหากยังไม่ได้รับการตรวจยืนยันในระดับยีน ควรรายงานเบื้องต้นเพียงว่า พบ Abnormal Hb หรือ Unidentify Abnormal Hb

จากการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆ จากการตรวจ Hb typing และการศึกษาเชิงลึกถึงระดับยีนเพื่อวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินทำให้ทราบข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไทย ข้อมูลที่ได้นับเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการ สำหรับใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและเป็นแนวทางในการพิจารณารายงานผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินผิดปกติให้สามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้องเหมาะสมตามหลักวิชาการ ช่วยลดความผิดพลาด ในการรายงานผล นับเป็นการสนับสนุนการดำเนินโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศ

สรุป

ฮีโมโกลบินผิดปกติหลายชนิดมี Retention time ที่ใกล้เคียงกัน ไม่สามารถแยกกันได้จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ทั้งโดยวิธี HPLC และ LPLC หากต้องการทราบชนิดของฮีโมโกลบินต้องตรวจยืนยันโดยวิธี DNA sequencing

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้งบประมาณสนับสนุน ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกแห่งที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีตลอดการดำเนินงาน ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่อง ABI 3130 ขอขอบคุณคุณอัจฉรียา ลูกบัวที่ช่วยนำตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI 3130 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาพเสื่อม ศูนย์ชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สมชาย แสงกิจพร, สิริภากร แสงกิจพร. ธาลัสซีเมีย โรคเลือดจางทางพันธุกรรมที่ป้องกันได้. พิมพ์ครั้งที่ 6. นนทบุรี: ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2555.
2. Huisman THJ, Carver MFH, Efremov GD. A syllabus of human hemoglobin variants. Georgia: The Sickle Cell Anemia Foundation in Augusta; 1996.
3. Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravatmuang P, Winichagoon P, Fucharoen S. Thalassemia in Thailand. Ann N Y Acad Sci 1980; 344:352-63.
4. Fucharoen S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. Indian J Med Res 2011;134:498-506.
5. คณะกรรมการจัดทำคู่มือการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน. คู่มือการตรวจ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน. พิมพ์ครั้งที่ 1 นนทบุรี: ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553.
6. Clinical Diagnostics Group. Variant™ hemoglobin testing system operation manual. California: Bio-Rad Laboratories; 1996.
7. Drew Scientific Group. HbGold Analyser User's Manual. Cambria, UK: Drew Scientific Limited; 2001.
8. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1977;74:5463-7.
9. Applied Biosystems. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide. California: Applied Biosystems; 2009.
10. Torres FR, Ondei LS, Zamaro PJA, Silva RU, Cavasini CE, Rossit ARB, Machado RLD, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin I-Philadelphia (alpha 16 (A14) LYS-GLU) heterozygote among blood donors from Brazil. Genet Mol Res 2006;5:713-6.

11. วิชัย เหล่าสมบัติ. Clinical and genotype interaction of β-thalassemia. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2543; 3-5 พฤษภาคม 2543; ณ โรงแรมเจบี หาดใหญ่. สงขลา: บริษัทรวยเจริญการพิมพ์ จำกัด; 2543.

12. Sangkitporn SK, Eksiri L, Sangnoi A, Duangruang S, Dumbua A, Rattanakittisophon K, Sangkitporn S. Identification of β-globin gene mutations in Thailand using an automated fluorescence-based DNA sequencer. Int J Lab Hematol 2009;31:521-7.

13. Sangkitporn S, Sangkitporn SK, Sangnoi A, Duangruang S. Detection of Hb E mutation (β26, GAG-AAG, Glu-Lys) using allelic discrimination analysis. Int J Lab Hematol 2009;31:74-80.

14. สาวิตรี ด้วงเรือง, สิริภากร แสงกิจพร, บุญนิภา สุวรรณกาล, อัจฉราพร ดำบัว, กัญญรัตน์ รัตนกิตติโสภณ, ละอองดาว เอกศิริ, สมชาย แสงกิจพร. การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีน α^{CS} (α^2-globin Gene, Codon 142: TAA-CAA) โดยเทคนิค Allelic Discrimination. วารสารเทคนิค การแพทย์และกายภาพบำบัด 2549;18:34-42.

Abstract **Characteristic Properties of Hemoglobin Variants by Hemoglobin Separation and Quantitation Analysis**

Areerat Khorchai B.Sc., M.Sc.*; Siripakorn Sangkitporn B.Sc., M.Sc.*; Sawitree Duangrueng B.Sc.*; Chonlada Yodtup B.Sc.*; Acharaporn Dambua B.Sc.*; Apichat Chotchusri B.Sc.*; Patcharaporn Boonchoo B.Sc.*; Somchai Sangkitporn M.D., Ph.D.**

** Medical Life Science Center, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; ** National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health*

Journal of HealthScience 2013;22:1042-51.

Hemoglobin variants are caused by the synthesis of abnormal globins structure or abnormal type of amino acids. This research was conducted to study the retention time of hemoglobin variants by automated HPLC and LPLC. All samples were confirmed by DNA sequencing. In this study, 23 hemoglobin variants were identified. Nine α-globin variants are Hb I, Hb J-Norfolk, Hb Q-Thailand, Hb Grey Lynn, Hb O-Indonesia, Hb Westmead, Hb Quong Sze, Hb Pakse and Hb CS. Fourteen β-globin variants are Hb C, Hb G-Makassar, Hb S, Hb Malay, Hb E, Hb J-Bangkok, Hb J-Kaohsiung, Hb Korle Bu, Hb Pyrgos, Hb D Los Angeles, Hb Tende, Hb Dhonburi, Hb Hope and Hb Tak. The results from Hb typing by automated HPLC and LPLC shows hemoglobin elution peak with retention time 1.41-5.14 minutes and 71-367 seconds, respectively. In the separation of hemoglobin variants by HPLC and LPLC, three identical patterns of elution peaks were observed. The first group had retention times in the S-window such as Hb S, Hb Q-Thailand and Hb G Makassar, the second group was in the D-window such as Hb D Los Angeles, Hb Tak and Hb Korle Bu, and the third group was in the A window such as Hb Dhonburi, Hb Malay, Hb Quong Sze and Hb Westmead. Therefore, it is recommended that routine clinical laboratory reports should not specify the type of rare hemoglobin variants and simply report as abnormal hemoglobin. Identification of the type of hemoglobins can only be made through DNA sequencing or amino acid analysis.

Key words: hemoglobin variants, hemoglobin separation and quantitation analysis