

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# การเปลี่ยนแปลงของสัดส่วน hemoglobin (Hb) E และ Hb F จากการมี $\alpha$ -thalassemia ร่วม ในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบ

มณฑิรา จันทร์อิน<sup>1</sup> ปรีศนา เจริญพร<sup>1</sup> สวิษฐาพร เจริญนิ่ม<sup>1</sup> ปวันรัตน์ สนวนุ่ม<sup>1</sup> ศิริพัฒน์ ม่วงป่า<sup>2</sup> เอกอมร เทพพรหม<sup>1</sup> วริสตา เตียววิศเรศ<sup>1</sup> และ พีระพล วอง<sup>1</sup>

<sup>1</sup>หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

### บทคัดย่อ

**บทนำ** ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและสัดส่วนของ hemoglobin (Hb) สามารถถูกรับรู้ได้จาก  $\alpha$ -thalassemia allele ซึ่งพบร่วมกันได้บ่อยในประชากร **วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาชนิดและสัดส่วนของ Hb ที่เปลี่ยนแปลงจากการมี  $\alpha$ -thalassemia allele ร่วมด้วยในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบชนิดต่าง ๆ **วัสดุและวิธีการ** รวบรวมตัวอย่างเลือดจากคู่สามีภรรยาที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและกำหนดคู่เสี่ยงธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ระหว่างช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2557 ถึงมกราคม 2560 ตัวอย่างทั้งหมดผ่านการตรวจชนิดและสัดส่วนของ Hb ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography ได้ตัวอย่างในกลุ่ม compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia จำนวน 116 ราย homozygous Hb E จำนวน 403 ราย และ heterozygous Hb E จำนวน 332 ราย ทำการตรวจวิเคราะห์  $\alpha^0$ -thalassemia (Southeast Asian และ Thai deletion) และ  $\alpha^+$ -thalassemia (-3.7 kb และ -4.2 kb deletion) ด้วยวิธี gap-polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับเทคนิค Real-Time PCR ทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของ Hb E และ Hb F ในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีและไม่มียีน  $\alpha$ -thalassemia ร่วม **ผลการศึกษา** พบว่าในกลุ่ม compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia มีสัดส่วน Hb E เพิ่มขึ้นในขณะที่สัดส่วน Hb F ลดลงอย่างชัดเจนแปรตามจำนวน  $\alpha$ -globin ยีนที่ลดลงจาก  $\alpha$ -thalassemia สำหรับสัดส่วนของ Hb E และ Hb F ในธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบชนิดอื่น ๆ มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันเมื่อมี  $\alpha$ -thalassemia ร่วมด้วย **สรุป** จากการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า  $\alpha$ -thalassemia เป็นปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงลักษณะ phenotype ของกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบชนิดต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ Hb ดังกล่าว อาจทำให้การวินิจฉัยชนิดของธาลัสซีเมียผิดพลาด หากไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ genotype โดยเฉพาะในงานกำหนดคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia

**คำสำคัญ :** ● การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน ● แอลฟาธาลัสซีเมีย ● ฮีโมโกลบินอี

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2562;29:339-45.

ได้รับต้นฉบับ 24 พฤษภาคม 2562 แก้ไขบทความ 6 กรกฎาคม 2562 รับลงตีพิมพ์ 3 กันยายน 2562

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.นพ.พีระพล วอง หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก E-mail: peeraponw@nu.ac.th

## Original Article

# Alteration of hemoglobin (Hb) E and Hb F fraction from an alpha-thalassemia co-inheritance in Hb E related disorders

Monthira Chan-In<sup>1</sup>, Prissana Charoenporn<sup>1</sup>, Sawichayaporn Jernnim<sup>1</sup>, Pawanrat Suannum<sup>1</sup>, Siriphat Muangpa<sup>2</sup>, Akamon Tapprom<sup>1</sup>, Rawisut Deoisares<sup>1</sup> and Peerapon Wong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Thalassemia Research Unit, Hematology Research Center, Faculty of Medicine; <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University

---

### Abstract:

**Background:** Phenotypes of specific hemoglobin (Hb) could be altered by a co-inheritance of alpha thalassemia which commonly found in the population. **Objective:** The study aimed to demonstrate phenotypic alteration of each Hb fraction from an alpha thalassemia co-inheritance in Hb E related disorders. **Method:** The study was conducted using blood specimens and records of Hb analysis determined by high-performance liquid chromatography from a thalassemia prenatal control program at the Thalassemia Research Unit, Naresuan University Hospital between February 2014 and January 2017. Hb E related disorders were identified comprising 116 Hb E/beta thalassemia compound heterozygotes, 403 Hb E homozygotes and 332 Hb E heterozygotes. DNA method to detect alpha<sup>0</sup>-thalassemia (Southeast Asian and Thai deletion) and alpha<sup>+</sup>-thalassemia (-3.7 kb and -4.2 kb deletions) alleles were determined in all samples using gap-polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. Fractions of Hb E and F were compared between specific Hb E related disorders with different copy numbers of alpha globin genes. **Result:** In Hb E/beta thalassemia compound heterozygote, fractions of Hb E substantially increased correlated with lesser copy numbers of alpha-globin genes, while fractions of Hb F changed in the opposite direction. Fractions of Hb E and Hb F in other Hb E related disorders were significantly affected by an alpha-thalassemia co-inheritance. **Conclusion:** Our study demonstrated a pattern of phenotypic alteration of Hb fractions in specific Hb E related disorders with different copy numbers of alpha globin genes. The misdiagnosis problem could have occurred in prenatal control for beta-thalassemia, which relies on phenotypic diagnosis using Hb analysis.

**Keywords :** ● Hemoglobin analysis ● Alpha-thalassemia ● Hemoglobin E

**J Hematol Transfus Med.** 2019;29:339-45.

## บทนำ

Hemoglobin (Hb) E เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมของ Hb ที่พบได้บ่อยในกลุ่มประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทย พบความชุกประมาณร้อยละ 20-30<sup>1</sup> กลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบสามารถพบได้หลากหลายชนิดโดยชนิดที่มีความสำคัญและพบได้บ่อยในการตรวจวินิจฉัยเพื่อควบคุมโรคธาลัสซีเมีย ได้แก่ heterozygous Hb E, homozygous Hb E และ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia เนื่องจากปัจจุบันกระบวนการควบคุม beta-thalassemia ในประชากรยังจำเป็นต้องใช้การตรวจชนิดและสัดส่วนของ Hb เป็นการตรวจขั้นพื้นฐานก่อนการตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา ดังนั้นปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อชนิดและสัดส่วนของ Hb ล้วนมีความสำคัญกับการตรวจวินิจฉัย ในบางภาวะได้แก่การมี nucleotide ของยีน gamma-globin บริเวณ -158 (*Xmn I* restriction site) ที่แตกต่างกัน (single nucleotide polymorphism; SNP) อาจทำให้ homozygous Hb E มีสัดส่วนของ Hb F สูงขึ้นอยู่ระหว่างร้อยละ 8.3-24.6<sup>2</sup> ซึ่งอาจทำให้วินิจฉัยผิดเป็น compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia และในทางกลับกัน compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia อาจมีสัดส่วนของ Hb F แตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 10-80 จากปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกับการสร้าง gamma-globin chain<sup>3</sup> และอาจวินิจฉัยผิดเป็น homozygous Hb E เช่นกัน ในบรรดาปัจจัยที่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ Hb การมียีน alpha-thalassemia ร่วมถือเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญดังกล่าว จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและสัดส่วนของ Hb เพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบชนิดต่าง ๆ สามารถถูกรบกวนได้จากการมี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย ซึ่งพบร่วมกันได้บ่อยในประชากร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ Hb โดยเฉพาะ Hb E และ Hb F ซึ่งใช้เป็น Hb หลักในการวินิจฉัยชนิดของ beta-thalassemia โดยมีรายงานการศึกษาที่ก่อนหน้านี้พบว่า สัดส่วนของ Hb F ใน compound heterozygous Hb E/beta<sup>+</sup>-thalassemia ที่มีการขาดหายไปของยีน alpha-globin จำนวน 2, 1 และ 0 ตำแหน่งจะมีระดับ Hb F เฉลี่ยร้อยละ 6.4, 12.3 และ 15.6 ตามลำดับ และใน compound heterozygous Hb E/beta<sup>0</sup>-thalassemia ที่มีการขาดหายไปของยีน alpha-globin จำนวน 2, 1 และ 0 ตำแหน่ง จะมีระดับ Hb F เฉลี่ยร้อยละ 9.9, 27.9 และ 34.8 ตามลำดับ<sup>1</sup> การศึกษาสัดส่วนของ Hb F ใน homozygous Hb E ที่มีการขาดหายไปของยีน alpha-globin จำนวน 2, 1 และ 0 ตำแหน่ง จะมีระดับ Hb F เฉลี่ยร้อยละ 1.7, 2.7 และ 4.2 ตามลำดับ<sup>4</sup> สำหรับสัดส่วนของ Hb E ใน heterozygous Hb E จะ

ขึ้นอยู่กับจำนวนของยีน alpha-globin ที่ขาดหายไปเช่นกัน ซึ่ง heterozygous Hb E ที่มีการขาดหายไปของยีน alpha-globin จำนวน 3, 2, 1 และ 0 ตำแหน่ง จะมีระดับ Hb E เฉลี่ยร้อยละ 11.9, 16.6, 23.7 และ 25.6 ตามลำดับ<sup>1</sup> อย่างไรก็ตามเนื่องจากความจำกัดของจำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจวัด รวมทั้งจำนวนและชนิดของ alpha thalassemia ที่พบร่วม ทำให้หลายการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสัดส่วนที่พบในบางชนิดของ Hb แม้จะเห็นความแตกต่างของ phenotype แล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังมีความหลากหลายของวิธีที่ใช้ตรวจวัดสัดส่วนของ Hb ในแต่ละการศึกษา งานวิจัยชิ้นนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ Hb E และ Hb F ในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบได้แก่ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia, homozygous Hb E และ heterozygous Hb E ที่มียีน alpha-thalassemia ร่วมจากการตรวจวัดด้วย high-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb ที่มีมานานและยังได้รับความนิยมในประเทศไทย

## วัสดุและวิธีการ

รวบรวมตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจชนิดและสัดส่วนของ Hb ด้วยวิธี HPLC โดยแยกส่งตรวจแบบเดี่ยว และตัวอย่างเลือดจากคู่อภิการยาที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและกำหนดคู่เสี่ยงธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ซึ่งผ่านการตรวจชนิดและสัดส่วนของ Hb ด้วยวิธี HPLC ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยาโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2557 ถึงมกราคม 2560 ทำการคัดเลือกเฉพาะกลุ่มตัวอย่างที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบได้แก่ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia, homozygous Hb E และ heterozygous Hb E

## วิธีดำเนินงาน

- นำตัวอย่างเลือดในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบได้แก่ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia, homozygous Hb E และ heterozygous Hb E มาสกัด DNA ด้วยวิธี chelex-100<sup>5</sup>
- ทำการตรวจวิเคราะห์ alpha<sup>0</sup>-thalassemia (Southeast Asian และ Thai deletion) และ alpha<sup>+</sup>-thalassemia (-3.7 kb และ -4.2 kb deletion) ด้วยวิธี gap-polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับเทคนิค real-time PCR<sup>6</sup> ในตัวอย่างทั้งหมด สำหรับในส่วน of heterozygous Hb E งานวิจัยชิ้นนี้ไม่ได้ทำการตรวจหา alpha<sup>+</sup>-thalassemia เนื่องจากปริมาณ DNA ไม่เพียงพอในหลายตัวอย่าง

3. เปรียบเทียบค่ามัธยฐานของสัดส่วน Hb E และ Hb F ในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบชนิดต่าง ๆ ที่มีจำนวน locus ของ alpha globin gene ต่างกันโดยใช้การทดสอบ Kruskal-Wallis กรณีเปรียบเทียบระหว่าง 3 กลุ่มข้อมูล และใช้การทดสอบ Mann-Whitney U กรณีเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มข้อมูล

### ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจชนิดและสัดส่วนของ Hb ด้วยวิธี HPLC โดยแยกส่งตรวจแบบเดี่ยวจำนวน 1,694 ราย พบ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia จำนวน 116 ราย สำหรับตัวอย่างเลือดของคู่สามีภรรยาที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและกำหนดคู่เสี่ยงธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจำนวนทั้งหมด 6,023 คู่ พบ homozygous Hb E จำนวน 403 ราย และ heterozygous Hb E จำนวน 4,045 ราย นำตัวอย่างเลือดของ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia และ homozygous Hb E ทั้งหมดที่ตรวจพบมาทำการตรวจเพิ่มเติม โดยส่วนของ heterozygous Hb E เนื่องจากมีตัวอย่างจำนวนมากจึงทำการคัดเลือกมาเพียงบางส่วน จำนวน 332 ราย ทำการเปรียบเทียบสัดส่วน Hb E และ Hb F ในกลุ่มธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบ ที่มีและไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย ข้อมูลแสดงดัง Table 1 ในกลุ่ม compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia, alpha<sup>+</sup>-thalassemia และไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย มีค่ามัธยฐานและพิสัยของสัดส่วน Hb E เท่ากับร้อยละ 78.7 (73.8-85.9), 56.1 (45.5-80.4) และ 50.1 (24.6-97.3) ตามลำดับ

( $p < 0.05$ ) สัดส่วนของ Hb F เท่ากับร้อยละ 3.8 (2.0-13.8), 21.5 (2.7-50.7) และ 33.9 (7.8-62.5) ตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) (Figure 1) สำหรับกลุ่ม homozygous Hb E ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia, alpha<sup>+</sup>-thalassemia และไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย มีค่ามัธยฐานและพิสัยของสัดส่วน Hb E เท่ากับร้อยละ 80.2 (67.0-87.1), 78.5 (64.0-86.3) และ 78.6 (59.7-90.0) ตามลำดับ ( $p = 0.76$ ) สัดส่วนของ Hb F เท่ากับร้อยละ 3.2 (0.8-7.5), 2.5 (0.9-12.9) และ 3.3 (0.9-14.5) ตามลำดับ ( $p = 0.001$ ) ทั้งนี้หากทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของ Hb F ในกลุ่ม homozygous Hb E เฉพาะระหว่างกลุ่มที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia และไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.29$ ) สำหรับกลุ่มประชากร heterozygous Hb E ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia และไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย มีค่ามัธยฐานและพิสัยของสัดส่วน Hb E เท่ากับร้อยละ 18.1 (11.4-29.1) และ 26.9 (19.3-31.4) ตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) สัดส่วนของ Hb F เท่ากับร้อยละ 1.0 (0.4-8.0) และ 0.7 (0.3-3.8) ตามลำดับ ( $p < 0.05$ )

### วิจารณ์

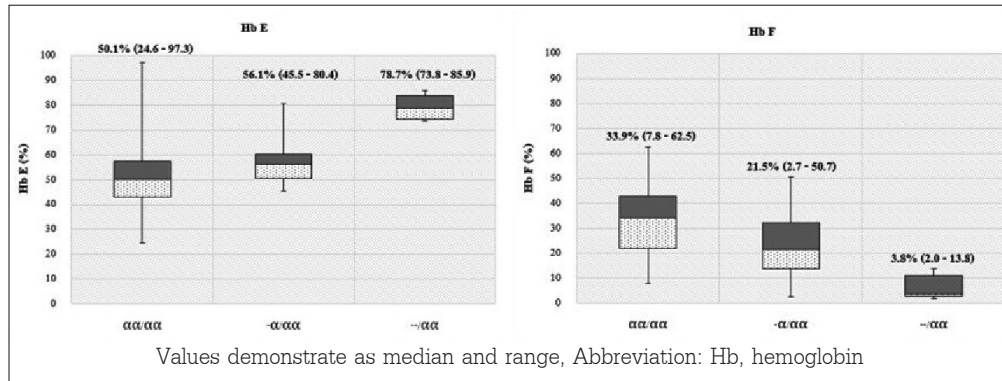
การศึกษาสัดส่วนของ Hb E และ Hb F จากการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่เปลี่ยนแปลงจากการมี alpha-thalassemia ร่วมในกลุ่มตัวอย่างธาลัสซีเมียที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า alpha-thalassemia เป็นปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงลักษณะ phenotype ของ Hb E related disorder ชนิดต่าง ๆ จากผลการศึกษาในกลุ่ม compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia ที่มี alpha-thalassemia allele ร่วม

**Table 1** Comparison of Hb E and Hb F fraction in various Hb E related disorders with different copy numbers of alpha-globin gene

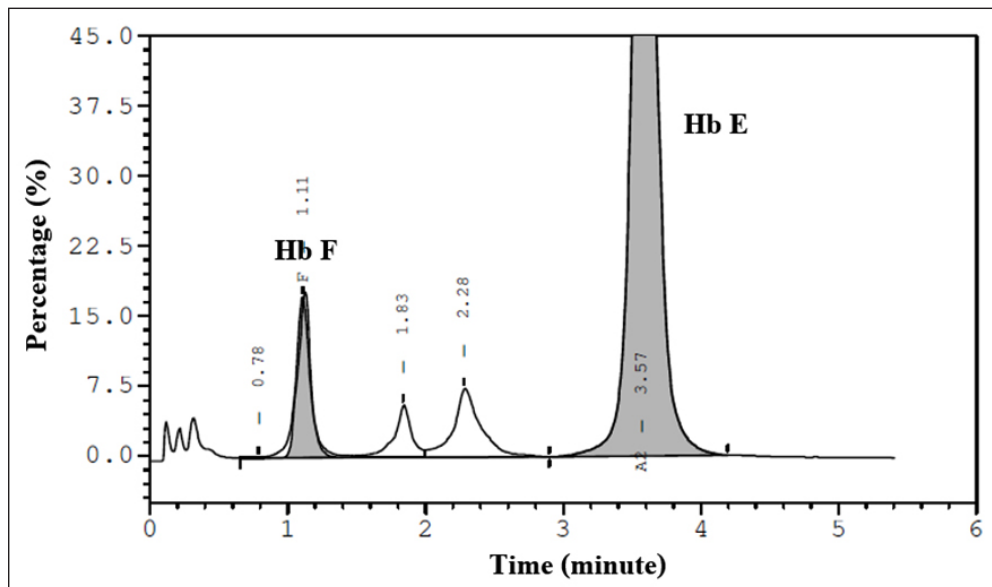
		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha\alpha$	p-value
		n = 82	n = 28	n = 6	
Compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia	Hb E(%)	50.1 (24.6-97.3)	56.1 (45.5-80.4)	78.7 (73.8-85.9)	< 0.05*
	Hb F(%)	33.9 (7.8-62.5)	21.5 (2.7-50.7)	3.8 (2.0-13.8)	
		n = 283	n = 91	n = 29	
Homozygous Hb E	Hb E(%)	78.6 (59.7-90.0)	78.5 (64.0-86.3)	80.2 (67.0-87.1)	0.760
	Hb F(%)	3.3 (0.9-14.5)	2.5 (0.9-12.9)	3.2 (0.8-7.5)	0.001*
		n = 50		n = 282	
Heterozygous Hb E	Hb E(%)	26.9 (19.3-31.4)	NA	18.1(11.4-29.1)	< 0.05*
	Hb F(%)	0.7 (0.3-3.8)	NA	1.0 (0.4-8.0)	

Values demonstrate as median and range

\*significant difference ( $p < 0.05$ ); Hb, hemoglobin; NA, Not available



**Figure 1** Comparison of Hb E and Hb F fraction in compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia with different copy numbers of alpha-globin gene



**Figure 2** Representative chromatogram of a subject with compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia who has a low hemoglobin F phenotype caused by an alpha<sup>0</sup>-thalassemia co-inheritance

ด้วยแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการมี alpha-thalassemia allele ร่วมในกลุ่มประชากรนี้จะทำให้มีสัดส่วนของ Hb E สูงขึ้นและ Hb F ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ทั้งนี้รายงานวิจัยชิ้นนี้ยังแสดงให้เห็นสัดส่วนของ Hb F ในระดับที่ต่ำมากใน compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia allele ร่วมด้วย ซึ่งหากนำมาพิจารณาพร้อมกับสัดส่วนของ Hb E ที่สูงขึ้น อาจทำให้วินิจฉัยผิดเป็น homozygous Hb E ดังที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้<sup>7</sup> (Figure 2) สำหรับการศึกษากลุ่ม homozygous Hb E ในงานวิจัยชิ้นนี้พบสัดส่วนของ Hb F ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในกลุ่มที่มี alpha<sup>+</sup>-thalassemia ร่วมเท่านั้น ต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบการลดลงของสัดส่วน Hb F ชัดเจนมากขึ้นตามจำนวนของยีน alpha-globin ที่ลดลง<sup>4</sup> อย่างไรก็ตามผลการวิจัยที่ได้ยังคงแสดงให้เห็น

เห็นการลดลงของสัดส่วน Hb F ในกลุ่ม alpha<sup>0</sup>-thalassemia และ alpha<sup>+</sup>-thalassemia แม้จะไม่เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม alpha<sup>0</sup>-thalassemia ก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มตัวอย่าง homozygous Hb E ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia ร่วมในงานวิจัยชิ้นนี้อาจมีปัจจัยทางพันธุกรรมอื่นที่มีอิทธิพลมากกว่ามาดบังผลจาก alpha<sup>0</sup>-thalassemia เนื่องจากยังมีปัจจัยทางพันธุกรรมอื่นๆ ที่มีผลต่อสัดส่วน Hb F ที่ไม่ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น SNP หลายตำแหน่ง ทั้งที่อยู่บน gamma globin gene (เช่น *Xmn I* restriction site) ตำแหน่ง BCL11A gene และ HBS1L-MYB intergenic region ล้วนแล้วแต่มีผลกับระดับ Hb F<sup>8</sup> นอกจากนี้การคัดเลือกตัวอย่าง homozygous Hb E ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ ทำโดยการตรวจ phenotype ด้วย HPLC ไม่ได้ทำการตรวจ genotype จึงอาจมีโอกาสคัดเลือก compound

heterozygous Hb E/beta-thalassemia ซึ่งมีระดับ Hb F สูงกว่า เข้ามาในกลุ่ม และเนื่องจากกลุ่มตัวอย่าง homozygous Hb E ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia ร่วมด้วยในการศึกษานี้มีขนาดเล็ก จึงอาจทำให้ปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นมีผลต่อค่ามัธยฐานของสัดส่วน Hb F ของกลุ่ม แม้จะเห็นการลดลงของค่ามัธยฐานเทียบกับกลุ่มที่ไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย แต่ไม่มากพอที่จะเห็นความแตกต่างทางสถิติ สำหรับในส่วนของ heterozygous Hb E พบสัดส่วนของ Hb E ที่ลดลงในกลุ่มที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia ร่วมด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ<sup>9,10</sup> แต่งานวิจัยชิ้นนี้กลับแสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของสัดส่วน Hb F ซึ่งไม่ควรจะเป็นโดยหลักการทางทฤษฎี ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วน Hb A เพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous Hb E ที่นำมาศึกษา ระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มี alpha-thalassemia allele ร่วมด้วย พบสัดส่วน Hb A เท่ากับร้อยละ 68.6 (49.7-77.1) และ 61.4 (57.8-69.6) ตามลำดับ (p < 0.05) โดยสัดส่วน Hb A เพิ่มขึ้นเมื่อมีจำนวนของยีน alpha-globin ลดลงซึ่งยังคงสอดคล้องกับหลักการจับคู่ของ globin chain แต่ไม่สามารถอธิบายการเพิ่มขึ้นของ Hb F ได้

โดยทั่วไปการจับคู่ของ globin chain เพื่อประกอบกันเป็น dimer อาศัยประจุที่เข้ากันได้ ของแต่ละ globin chain โดย alpha-globin จะเลือกจับกับ beta-globin ได้ดีกว่า beta-like globin chain เมื่อจำนวน alpha-globin chain ลดลง จะทำให้คุณสมบัติการเลือกจับกันระหว่าง alpha-globin chain กับ beta- และ beta-like globin chain มีความเด่นชัดมากขึ้น<sup>11</sup> ใน compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia ไม่มีการสร้าง beta-globin chain ดังนั้นเมื่อมีจำนวน alpha-globin chain ลดลงจากการมี alpha-thalassemia จะทำให้ alpha-globin เลือกจับกับ beta-like globin chain ที่มีประจุที่เหมาะสมกันมากที่สุด จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า alpha-globin เลือกจับกับ mutated beta-globin (beta<sup>E</sup>) ได้มากกว่า gamma-globin chain ทำให้สัดส่วนของ Hb E เพิ่มขึ้น ในขณะที่สัดส่วนของ Hb F ลดลง ในทำนองเดียวกับที่พบสัดส่วนของ Hb F ลดลงใน homozygous Hb E ที่มี alpha-thalassemia ร่วมด้วย สำหรับ heterozygous Hb E ที่ยังมีการสร้าง beta-globin chain ปกติ เมื่อจำนวนของ alpha-globin chain ลดลง alpha-globin จะเลือกจับกับ beta-globin chain ปกติมากขึ้น ทำให้สัดส่วนของ Hb A สูงขึ้น ในขณะที่สัดส่วนของ Hb E และ Hb F ลดลง ทั้งนี้ผลการศึกษาสัดส่วนของ Hb E และ Hb F ที่เปลี่ยนแปลงจากการมี alpha-thalassemia ร่วม ในงานวิจัยชิ้นนี้ให้ผลสอดคล้องเป็นส่วนใหญ่มากับหลักการจับคู่กันของ globin

chain โดยอาศัยประจุที่เข้ากันได้มากที่สุด ดังที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตามก็ยังมีส่วนที่ไม่สอดคล้อง ได้แก่ ไม่พบการลดลงของสัดส่วน Hb F ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia ร่วมด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่ม homozygous Hb E และกลับพบการเพิ่มขึ้นของสัดส่วน Hb F ที่มี alpha<sup>0</sup>-thalassemia ร่วมด้วย ในกลุ่ม heterozygous Hb E

การเปลี่ยนแปลงสัดส่วน Hb E และ Hb F จากการมียีน alpha-thalassemia ร่วมดังกล่าว มีความสำคัญอย่างยิ่งในการกำหนดความเสี่ยงของ beta-thalassemia กรณีคู่สามีภรรยาวินิจฉัยเป็น homozygous Hb E ในคนใดคนหนึ่ง และอีกคนหนึ่งได้รับการวินิจฉัยเป็น heterozygous Hb E หรือ homozygous Hb E จากการตรวจด้วย Hb analysis เนื่องจากการมี alpha-thalassemia allele ร่วมพบได้บ่อยในประชากร หากคู่สามีภรรยาคนใดคนหนึ่งมี genotype เป็น compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia การมียีน alpha-thalassemia ร่วม อาจทำให้สัดส่วนของ Hb F ลดลงมากจนต่ำกว่าร้อยละ 5 และทำให้สัดส่วน Hb E เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 80 ตามผลการศึกษาที่แสดงใน Table 1 ซึ่งอาจทำให้วินิจฉัยผิดเป็น homozygous Hb E และเมื่อจับคู่กับคู่สมรสที่เป็น heterozygous Hb E หรือ homozygous Hb E ทำให้มีโอกาสรisk ในการได้บุตรเป็นโรค compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia โดยในทางปฏิบัติพบความถี่ของ compound heterozygous Hb E/beta-thalassemia ที่ได้รับการวินิจฉัยผิดเป็น homozygous Hb E จากการตรวจด้วย HPLC ร้อยละ 1 ของตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัย homozygous Hb E ทั้งหมด<sup>7</sup> อย่างไรก็ตามการตรวจทางคลินิกดังกล่าวสามารถเพิ่มความมั่นใจในการวินิจฉัย หากทำการตรวจ Hb analysis อีกครั้ง ด้วยวิธี capillary electrophoresis เพื่อวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ในตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัย homozygous Hb E เพื่อยืนยันการวินิจฉัย<sup>12,13</sup> และหากยังไม่แน่ใจควรตรวจยืนยัน genotype ของ homozygous Hb E ด้วยวิธีการทดสอบทางอณูชีววิทยา

## สรุป

จากการศึกษาสัดส่วนของ Hb E และ Hb F ที่เปลี่ยนแปลงจากการมี alpha-thalassemia allele ร่วมแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า alpha-thalassemia เป็นปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงลักษณะ phenotype ของ กลุ่มประชากรที่มี Hb E เป็นส่วนประกอบ ชนิดต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงของสัดส่วน Hb ดังกล่าวจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงเสมอในงานกำหนดความเสี่ยงของ beta-thalassemia ที่ยังจำเป็นต้องใช้ Hb analysis เป็นพื้นฐานในการตรวจวินิจฉัย

## เอกสารอ้างอิง

1. Sae-ung N, Srivorakun H, Fucharoen G, Yamsri S, Sanchaisuriya K. Phenotypic expression of hemoglobins A<sub>2</sub>, E and F in various hemoglobin E related disorders. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;48:11-6.
2. Tachavanich K, Viprakasit V, Chinchang W, Glomglao W, Pung-Amritt P, Tanphaichitr VS. Clinical and hematological phenotype of homozygous hemoglobin E: revisit of a benign condition with hidden reproductive risk. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009;40:306-16.
3. Rees DC. Hemoglobin F and hemoglobin E/beta-thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22:567-72.
4. Pakdee N, Yamsri S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pissard S, Fucharoen S. Variability of hemoglobin F expression in hemoglobin EE disease: Hematological and molecular analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;53:11-5.
5. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991;10:506-13.
6. Pomprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansersri T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol.* 2008;80:510-4.
7. Wong P, Srichaiya A, Suannum P, Charoenporn P, Jernnim S, Chan-In M, et al. Frequency of hemoglobin E/ $\beta$ -thalassemia compound heterozygotes with low hemoglobin F phenotype among cases with a diagnosis of hemoglobin E homozygote, determined by high-performance liquid chromatography, in prenatal control program for  $\beta$ -thalassemia. *Ann Hematol.* 2017;96:1763-5.
8. Nuinon M, Makarasara W, Mushiroda T, Setianingsih I, Wahidiyat PA, Sripichai O, et al. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta<sup>0</sup>-thalassemia/hemoglobin E. *Hum Genet.* 2010;127:303-14.
9. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. Molecular and hematologic features of hemoglobin E heterozygotes with different forms of  $\alpha$ -thalassemia in Thailand. *Ann Hematol.* 2003;82:612-6.
10. Chaibunruang A, Prommetta S, Yamsri S, Fucharoen G, Sae-Ung N, Sanchaisuriya K, et al. Molecular and hematological studies in a large cohort of  $\alpha^0$ -thalassemia in northeast Thailand: data from a single referral center. *Blood Cells Mol Dis.* 2013;51:89-93.
11. Steinberg M, Adams J. Hemoglobin A<sub>2</sub>: Origin, Evolution, and Aftermath. *Blood.* 1991;78:2165-77.
12. Singha K, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. EE score: an index for simple differentiation of homozygous hemoglobin E and hemoglobin E- $\beta^0$ -thalassemia. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56:1507-13.
13. Pornprasert S, Tookjai M, Punyamung M, Kongthai K. A Formula to Identify Potential Cases of  $\beta$ -Thalassemia/Hb E Disease Among Patients With Absent Hb A, Hb E > 75% and Hb F Between 5 and 15%. *Lab Med.* 2019;50:158-62.

