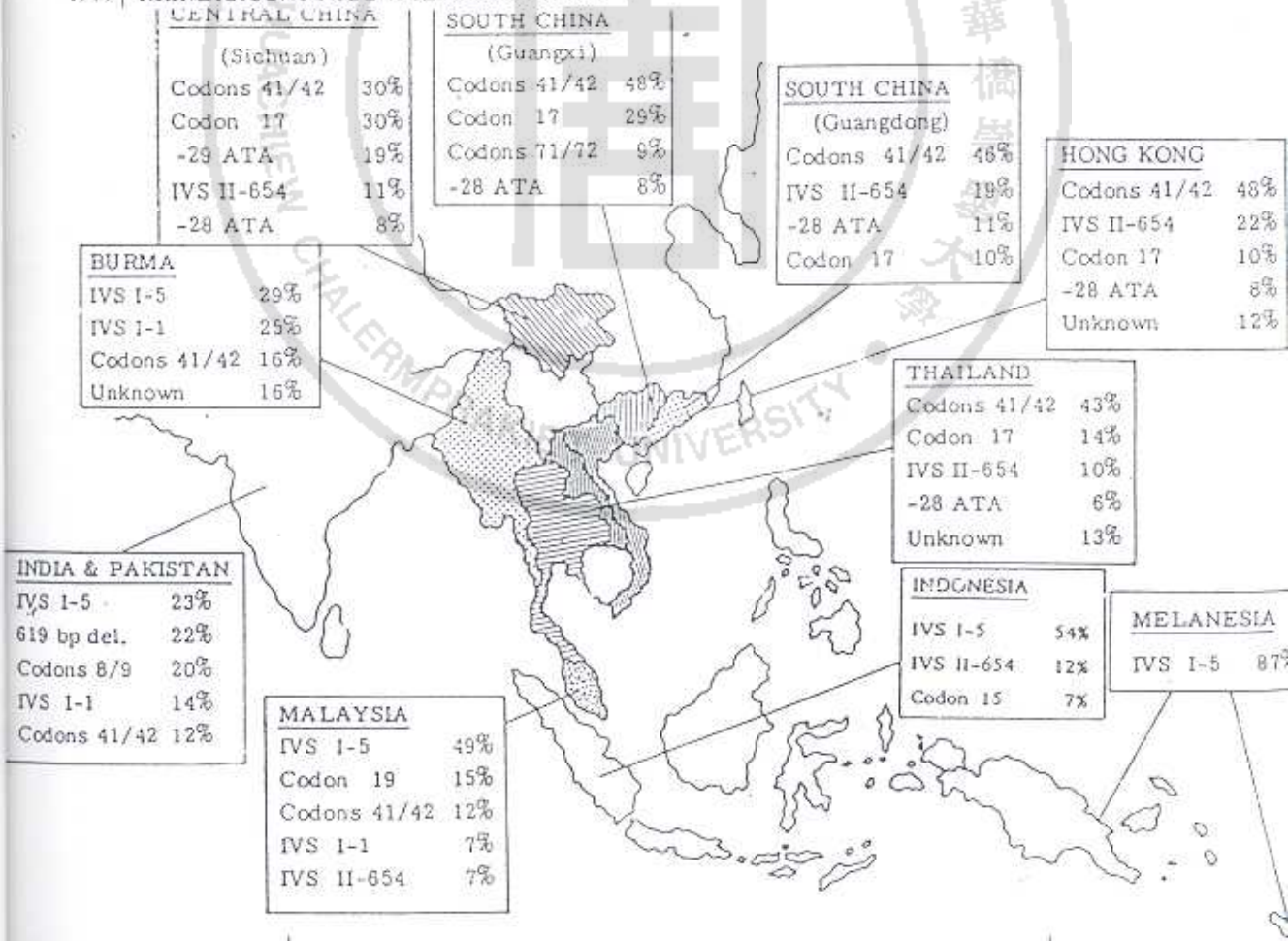
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

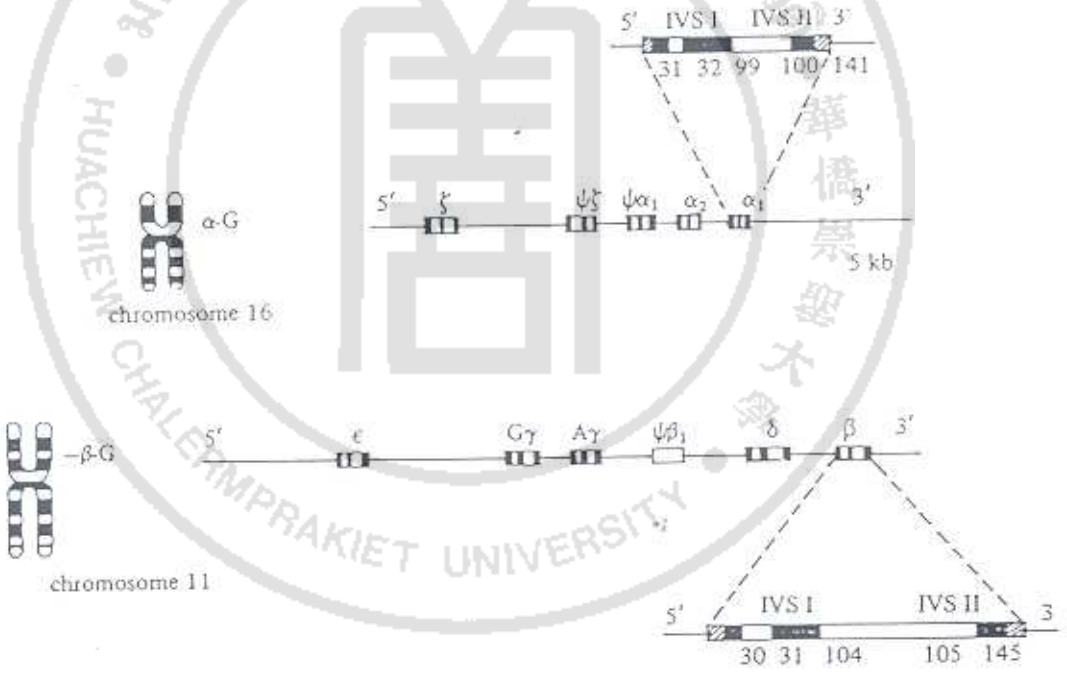
ธาลัสซีเมีย เป็นโลหิตจางชนิดหนึ่งที่ถ่ายทอดได้ทางกรรมพันธุ์ เกิดจากความผิดปกติในการสร้างสายโกลบิน กล่าวคือมีการสร้างสายโกลบินน้อยกว่าปกติ ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ตามมา คำว่า "thalassemia" มาจาก "thalassa" เป็นภาษากรีก หมายถึง ทะเล เพราะว่า ธาลัสซีเมียพบครั้งแรกในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean) ซึ่งรายงานครั้งแรกโดย Cooley และ Lee ในคนไข้ thalassemia major ซึ่งในขณะนั้นเรียกว่า Cooley syndrome และเนื่องจากธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติในการสร้างสายโกลบิน ดังนั้นความรุนแรงของโรคจึงขึ้นอยู่กับชนิดของความผิดปกติ ซึ่งอาการที่เกิดจากความผิดปกติของการสร้างสายโกลบินนี้มีได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ (silence carrier) หรือผิดปกติเพียงเล็กน้อย (thalassemia trait) ไปจนกระทั่งแสดงความผิดปกติในขั้นรุนแรง (thalassemia major) ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่พบได้ทั่วโลก แต่พบมากในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน, อาฟริกา, ตะวันออกกลาง และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งอุบัติการของธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงอุบัติการของการธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ในไทยและประเทศเพื่อนบ้าน[5]

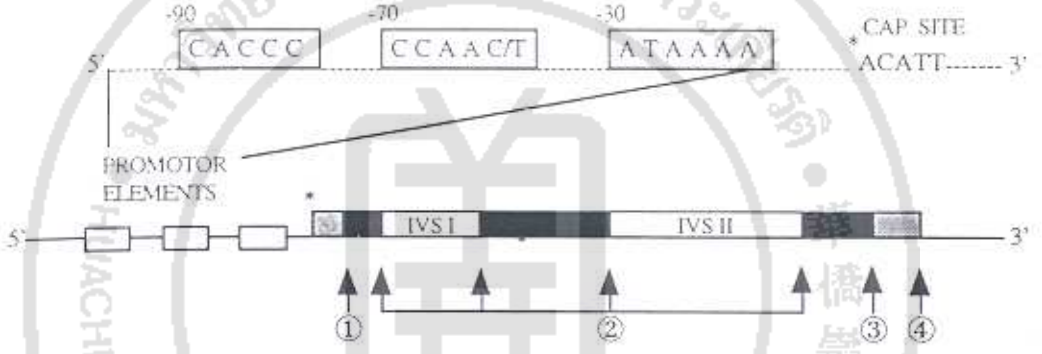
2.1 สาเหตุของธาลัสซีเมีย

ธาลัสซีเมียเกิดจากการสร้างฮีโมโกลบินลดลงเนื่องจากความผิดปกติในการสร้างสายโกลบิน อันเป็นผลมาจากความผิดปกติของยีน ที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินชนิดนั้นๆ ปกติแล้วยีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และ 16 โดยบนโครโมโซมคู่ที่ 11 จะมียีนที่ควบคุมการสร้างโกลบินชนิดบีตา (β globin gene) ชนิดเดลตา (δ globin gene) ชนิดแกมมา (γ globin gene) ชนิดแอฟซิลอน (ε globin gene) และ pseudo β gene (ψβ) ซึ่งเป็นยีนที่มีโครงสร้างคล้ายยีนชนิดบีตาแต่ไม่ได้ทำหน้าที่สร้างสายโกลบินชนิดบีตา ส่วนบนโครโมโซมคู่ที่ 16 จะมียีนที่ควบคุมการสร้างโกลบินชนิดแอลฟา (α globin gene) ชนิดซีตา (ζ globin gene) และ Pseudo α gene (ψα) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงเรียงตัวของยีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และคู่ที่ 16 โดยขยายตำแหน่งของเนื้อยีนซึ่งมีสองส่วนคือส่วนที่เป็นรหัสในการสร้างสายโกลบิน (coding sequence; ■) และส่วนที่ไม่ใช่รหัสในการสร้างสายโกลบิน (noncoding sequence; □)[9]

ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินมีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้ ส่วนแรกเรียกว่า initiator codon เป็นรหัสตัวแรกในการสร้างสายโกลบิน ส่วนที่สองเรียกว่า exon เป็นส่วนที่เก็บรหัสในการสร้างสายโกลบิน (coding sequence) ส่วนที่สามเรียกว่า intron เป็นบริเวณที่ไม่ได้เก็บรหัสในการสร้างสายโกลบิน (noncoding sequence หรือ intervening sequence; IVS) ซึ่งจะถูกตัดออกในขบวนการ RNA processing ส่วนที่สี่เรียกว่า splice site เป็นบริเวณที่ทำการตัดต่อ intron และ exon ส่วนที่ห้าเรียกว่า terminator codon เป็นรหัสหยุดสำหรับการสร้างสายโกลบิน และส่วนสุดท้ายเรียกว่า poly A tail เป็นบริเวณที่ช่วยให้ mRNA มีเสถียรภาพมากขึ้น



ภาพที่ 3 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของยีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบิน ได้แก่ initiator codon(1), splice site(2), terminator codon(3) และ poly A tail(4)[10]

ความผิดปกติของส่วนประกอบเหล่านี้ของยีนจะทำให้การสร้างสายโกลบินลดลง ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวได้แก่

1. **การกลายพันธุ์ของ promoter area (mutation in promoter area)** promoter area คือส่วนของ DNA ที่อยู่ด้านหน้า (5') ของยีน มีความสำคัญต่อความแม่นยำและประสิทธิภาพของขบวนการ transcription เพื่อสร้าง mRNA ถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงของ nucleotide base ใน promoter area จะทำให้ความแม่นยำและประสิทธิภาพในขบวนการ transcription ลดลง ทำให้มีการสร้าง mRNA น้อยลง การเกิดธาลัสซีเมียจากกลไก mutation in the promoter area นี้พบใน β thalassemia เป็นส่วนใหญ่

2. **การขาดหายไปของยีน** (gene deletion) การขาดหายไปบางส่วนของยีนหรือขาดหายไปทั้งชิ้นของยีน ส่งผลให้การสร้างสายโกลบินลดลงหรือไม่มีการสร้างสายโกลบินเลยสาเหตุของธาลัสซีเมียเนื่องจากการขาดหายไปของยีนส่วนใหญ่พบในธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา (α thalassemia)

3. **ความผิดปกติที่เกิดขึ้นเนื่องจากขบวนการ RNA processing (RNA processing defect)** ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการ RNA processing มักจะทำให้เกิดจุดตัด (splicing site) แห่งใหม่เพิ่มขึ้น เมื่อเกิดขบวนการตัดเชื่อม RNA (RNA splicing) ถ้าการตัดเชื่อม RNA เกิดขึ้นที่จุดตัดเดิมก็จะได้ mRNA ที่ปกติ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าการตัดเชื่อม RNA เกิดขึ้นที่จุดตัดใหม่จะทำให้ได้ mRNA ที่ผิดปกติและไม่สามารถเป็นแม่แบบในการสร้างสายโกลบินได้ ด้วยกลไกนี้เองทำให้มีการสูญเสีย mRNA ไปบางส่วนทำให้ปริมาณการสร้างสายโกลบินน้อยลงกว่าปกติ การเกิด ธาลัสซีเมียจากกลไกดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่พบใน β^+ thalassemia

4. nonfunctional mRNA อาจเกิดจาก nonsense mutation หรือ frameshift mutation ทำให้ขบวนการ translation ในการสร้างสายโกลบินสิ้นสุดลงก่อนที่จะสร้างสายโกลบินให้ครบสาย ทำให้สายโกลบินที่ได้สั้นกว่าปกติและถูกทำลายไป ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของ β^0 thalassemia นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่ initiator codon ก็จะทำให้ไม่มีการสร้างสายโกลบินจาก mRNAได้เช่นเดียวกัน

5. RNA cleavage และ polyadenylation ปกติแล้ว mRNA ที่สร้างขึ้นเมื่อจะออกสู่ไซโตพลาสม (Cytoplasm) จะต้องผ่านขบวนการ polyadenylation ซึ่งเป็นการเติม adenylic acid (A) เข้าไปที่ปลาย 3' ของ mRNA หลายๆ ตัวเรียกว่า poly (A) tail ซึ่งเข้าใจว่า poly (A) tail นี้ช่วยให้ mRNA ที่ผ่านออกสู่ไซโตพลาสมมีเสถียรภาพมากขึ้น การกลายพันธุ์ที่บริเวณนี้จะทำให้ mRNA ผ่านออกไปสู่ไซโตพลาสมได้น้อยลง ส่งผลให้การสร้างฮีโมโกลบินลดลงด้วย

6. cap site defect การเปลี่ยนแปลงของเบสที่บริเวณ cap site ทำให้ RNA ขาด capping ซึ่งเป็นบริเวณที่ ribosome จะเข้ามาจับและเริ่มขบวนการ translation ในไซโตพลาสม ทำให้การสร้างฮีโมโกลบินลดน้อยลง

2.2 ชนิดของธาลัสซีเมีย

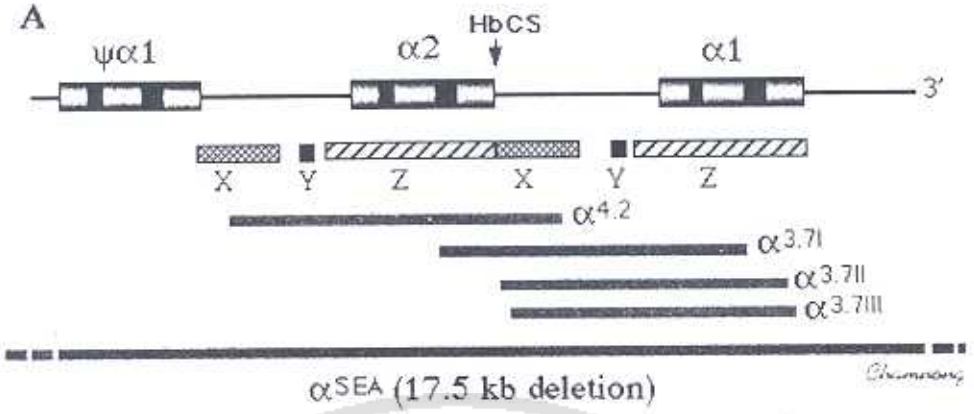
ธาลัสซีเมียแบ่งตามชนิดของความผิดปกติของสายโกลบินได้ 2 ชนิดคือธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา (α thalassemia) ซึ่งมีความผิดปกติในการสร้างสายโกลบินชนิดแอลฟา และธาลัสซีเมียชนิดบีตา (β thalassemia) ซึ่งมีความผิดปกติในการสร้างสายโกลบินชนิดบีตา และอาจจะพบความผิดปกติร่วมกับสายโกลบินชนิดเดลตา แกมมาในบางครั้ง

2.2.1 ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา (α thlassemia)

ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาส่วนใหญ่เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปเป็นท่อนยาวหลายกิโลเบส (large deletion) ทำให้การสร้างสายโกลบินชนิดแอลฟาลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ความรุนแรงที่เกิดจะขึ้นอยู่กับจำนวน α globin gene ที่ขาดหายไป ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามความผิดปกติในระดับยีนได้ 2 ชนิดคือ

1. **ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา** 1 (α-thalassemia 1) หรือธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาศูนย์ (α^0-thalassemia) ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาชนิดนี้จะไม่มีการสร้างสายโกลบินชนิดแอลฟาเลย ส่วนใหญ่เกิดจาก α globin gene ทั้ง 2 โลไซ (loci) ขาดหายไป ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 ที่พบบ่อยในอาเซียอาคเนย์รวมทั้งในประเทศไทยคือชนิด SEA (Southeast Asia type) เกิดจากยีนขาดหายไป 17.5 กิโลเบส และชนิดที่พบบ่อยแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนี่ยนคือชนิด Med (Mediterranean type) มียีนขาดหายไปประมาณ 17 กิโลเบส มีชนิดอื่นๆที่พบไม่บ่อยอีกประมาณ 10 ชนิด เช่น ชนิด Thai มีรายงานในคนไทยภาคเหนือ 1 ครอบครัว เกิดจากยีนขาดหายไปยาวประมาณ 34-38 กิโลเบส[11-13]

2. **ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา** 2 (α-thalassemia 2) หรือ ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาบวก (α^+-thalassemia) ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาชนิดนี้สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าปกติ มีอาการรุนแรงน้อยกว่าธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 ความผิดปกติส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปบางส่วนของยีน 1 ยีน ทำให้เหลือ α globin gene เพียงยีนเดียวที่ทำหน้าที่ได้ ชนิดที่พบบ่อยคือชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ($\alpha^{-3.7}$) และ 4.2 กิโลเบส ($\alpha^{-4.2}$) ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 2 นี้พบได้บ่อยกว่า ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 มาก ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 2 นอกจากจะเกิดจากยีนขาดแล้ว ยังมีอีกหลายชนิดที่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ชนิดที่พบบ่อยคือ Hb Constant Spring (Hb CS) เป็นฮีโมโกลบินผิดปรกติที่เกิดจากการแทนที่เบส (base substitution) 1 ตัว ที่ terminator codon ซึ่งเป็นรหัสในการหยุดการสร้างสายโกลบินทำให้มีการสร้างสายโกลบินต่อไปจนกระทั่งถึง terminator codon ถัดไปอีก 31 codon สายโกลบินชนิดแอลฟาที่สร้างได้จึงยาวกว่าปกติและจะไม่เสถียร[10,14-15] ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ α globin gene ที่พบในประเทศไทยแสดงในรูปที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ α globin gene ที่พบในประเทศไทย[16]

ในคนปกติมี α gene อยู่ 4 ยีน จากพ่อ 2 ยีนและจากแม่ 2 ยีน ดังนั้นปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 และธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 2 จะทำให้แบ่งกลุ่มอาการของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

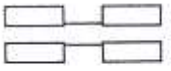
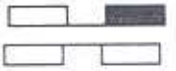
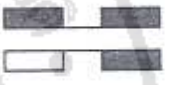
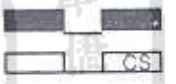
ก. α thalassemia 2 trait เกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 2 กับคนปกติ ทำให้เกิดการขาดหายไปของ α globin gene 1 ยีน (_α/αα) ทำให้มีการสร้างฮีโมโกลบินใน α thalassemia 2 trait น้อยกว่าคนปกติ แต่ถึงอย่างไรก็ตามปริมาณการสร้างฮีโมโกลบินที่ลดลงก็ไม่ได้ก่อให้เกิดความผิดปกติทางโลหิตวิทยา ค่า mean corpuscular volume (MCV) และ mean corpuscular hemoglobin (MCH) ปกติหรืออาจลดลงเล็กน้อย ในขณะแรกเกิดจะพบ Hb Bart's (γ_4) ได้เล็กน้อย (ร้อยละ 1-2) เมื่อโตขึ้น Hb Bart's จะหายไปทำให้การ α thalassemia 2 trait ต้องกระทำเมื่อตอนแรกเกิดโดยใช้เลือดจากสายสะดือ (cord blood) เพื่อตรวจหา Hb Bart's หรือใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) เพื่อหาตำแหน่งความผิดปกติบนสาย DNA ของ α globin gene

ข. α thalassemia 1 trait เกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 กับคนปกติ(heterozygous α^0 thalassemia;_ _/αα)หรือเกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 กับธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1(homozygous α^+ thalassemia; _α^+/_α^+) ซึ่งโดยสรุปแล้วจะมีการขาดหายไปของ α globin gene 2 ยีน ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาชนิดนี้มีความผิดปกติทางโลหิตวิทยาเล็กน้อย MCV MCH และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ปกติหรือลดลงเล็กน้อย ในทารกแรกเกิดพบ Hb Bart's ได้ร้อยละ 2 -10 และเมื่อโตขึ้น Hb Bart's จะหายไปทำให้การวินิจฉัย α thalassemia 1 trait ต้องกระทำเมื่อตอนแรกเกิดโดยใช้เลือดจากสายสะดือ (cord blood) เพื่อตรวจหา Hb Bart's หรือใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อหาตำแหน่งความผิดปกติบนสาย DNA ของ α globin gene เช่นเดียวกับ α thalassemia 2 trait

ค. Hb H disease เกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 กับธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 2 (heterozygous α^0 thal / α^+ thal; $_\alpha^0/_\alpha^+$) หรือเกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 กับ Hb CS (heterozygous α^0 thal/Hb CS; $_\alpha^{cs}/_\alpha^+$) โดยสรุปแล้วจะเกิดจากการขาดหายไปของ α globin gene 3 ยีน หรือเกิดจากการขาดหายไปของ α globin gene 2 ยีนร่วมกับ Hb CS ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาชนิดนี้มีการสร้างสายโกลบินชนิดแอลฟาลดลงมากกว่าปกติ ทำให้คนไข้มีอาการโลหิตจางปานกลาง ในทารกแรกเกิดจะพบ Hb Bart's ประมาณร้อยละ 10 - 40 และเมื่อโตขึ้นการสร้างสายโกลบินชนิดแกมมาจะลดลงและมีการสร้างสายบีตาแทนที่ ดังนั้นในผู้ใหญ่เราจะพบ Hb H (β_4) ได้ประมาณร้อยละ 30 - 40 Hb H มีสัมพันธภาพในการจับกับออกซิเจนได้ดีกว่า Hb A ประมาณ 10 เท่า แต่เป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร (unstable hemoglobin) จึงทำให้ Hb H ส่วนใหญ่จะตกตะกอนอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงกลายเป็น heinz body และเมื่อเม็ดเลือดแดงที่มี heinz body อยู่ภายในเมื่อผ่านเข้าไปในม้าม heinz body เหล่านั้นจะถูกกำจัดออกไปโดย mononuclear phagocytic cells ทำให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะที่เรียกว่า "pitted red cells" ซึ่งเป็นเหตุผลที่อธิบายการเกิด poikilocytosis นอกจากนั้นการที่มีฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรตกตะกอนอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงจะทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงมีความยืดหยุ่นน้อยลง (decrease deformability) ทำให้เม็ดเลือดแดงเหล่านั้นถูกทำลายได้ง่าย และเมื่อนำเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมาย้อมด้วย brilliant cresyl blue จะพบ granule สีน้ำเงินขนาดเล็กกระจายทั่วเม็ดเลือดแดงซึ่งมีลักษณะคล้ายลูกกอล์ฟ เรียกว่า inclusion bodies

ง. Hb Bart's hydrops fetalis เกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 กับธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา 1 (homozygous α^0 thal / α^0 thal; _ _/_ _) เกิดจากการขาดหายไปของ α globin gene ทั้ง 4 ยีน ดังนั้นจึงไม่มีการสร้างสายโกลบินชนิดแอลฟาเลย ฮีโมโกลบินส่วนใหญ่จะเป็น Hb Bart's และเนื่องจาก Hb Bart's จะมีสัมพันธภาพ (affinity) ในการจับกับออกซิเจนได้เป็นอย่างดี แต่จะไม่ค่อยปล่อยออกซิเจนเหล่านั้นให้กับเซลล์ ดังนั้นเด็กมักจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือเสียชีวิตหลังคลอดได้ไม่นาน โดยเด็กจะซีดมาก บวมน้ำ ตับและม้ามโต

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มอาการของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา[2]

Type	Genotype	Genotypic description α gene
Normal	αα/αα Normal	
α thalassemia 2 trait	α_/αα	heterozygous α^{+} thal (α thal 2 / normal) 
α thalassemia 1 trait	α_/_α	homozygous α^{+} thal (α thal 2 / α thal 2)
Hb H disease	--/-α --/$\alpha^{CS}\alpha$	heterozygous α^{0}thal/α^{+}thal (α thal 1 / α thal 2)  heterozygous α^{0}thal/HbCS (α thal 1 / Hb CS) 
Bart's hydrops fetalis	--/--	homozygous α^{0} thal (α thal 1 / α thal 1)

2.2.2 ธาลัสซีเมียชนิดบีตา (β thalassemia)

ธาลัสซีเมียชนิดบีตาเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างสายบีตา (β globin gene) ทำให้ปริมาณการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาลดลงหรือไม่มีการสร้างเลย ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ของ β globin gene การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่เกิดจากการที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไปเฉพาะจุด หรือเบสจำนวนน้อยๆขาดหายไป (small deletion) หรือเกินมา (small insertion) การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดธาลัสซีเมียชนิดบีตาสรุปได้ดังต่อไปนี้[5,13,15,18-20]

n. transcription mutation เกิดจากการแทนที่เบสตัวใดตัวหนึ่งที่ promoter area ชนิดที่พบบ่อยมี 2 ชนิดคือชนิดเบส C เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง -86 (-86, C-G) และชนิดเบส A เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง -28 (-28, A-G) การกลายพันธุ์กลุ่มนี้ทั้งหมดเป็น β^{+} thalassemia

ข. *nonfunctional mRNA* เป็นการกลายพันธุ์ที่ทำให้ mRNA ทำหน้าที่ไม่ได้ ธาลัสซีเมียชนิดนี้เกิดจากการแทนที่เบสเพียงตำแหน่งเดียวที่ทำให้เกิด terminator codon ขึ้นก่อนกำหนดและมีผลให้ mRNA ถอดรหัสต่อไม่ได้ (nonsense) การกลายพันธุ์ในลักษณะนี้พบใน β^0 thalassemia มีรายงานในประเทศไทย 3 ชนิดคือ การกลายพันธุ์ที่โคดอน 17 (A-T) โคดอน 35 (C-A) และโคดอน 26 (G-T)

ค. *frameshift mutation* เกิดจากการขาดหายหรือแทรกของเบสประมาณ 1-4 เบส มีผลให้ mRNA ทำหน้าที่ไม่ได้ หรือ mRNA ไม่เสถียร มีรายงานในประเทศไทย 3 ชนิด คือ ชนิดการกลายพันธุ์ที่เกิดจากยีนขาดหายไป 4 เบส ที่โคดอน 41-42 (-CTTT) เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย ชนิดที่มีเบส A 1 ตัวแทรกที่โคดอน 71-72 (–A) และชนิดเบส G 1 ตัวแทรกที่โคดอน 14-15 (+G)

ง. *RNA processing mutation* เป็นการกลายพันธุ์ที่ทำให้การตัดต่อ mRNA ผิดปกติมีรายงานแล้วกว่า 30 ชนิด การกลายพันธุ์ในกลุ่มนี้เกิดจากการตัด intron ในตำแหน่ง noncoding sequence ระหว่างขบวนการ RNA processing ผิดพลาด ซึ่งอาจเกิดจากการแทนที่เบสตรงจุดตัด (splice junction change) ทางด้าน 5' หรือ 3' ของ intron ทำให้ไม่สามารถตัดอินทรอนออกไปได้ การกลายพันธุ์ในลักษณะนี้ส่วนใหญ่พบใน β^0 thalassemia เช่น การกลายพันธุ์ที่เบสที่ 1 ของ intron 1 (IVS-1 nt 1, G-T) หรือเกิดการแทนที่เบสตรงบริเวณใกล้จุดตัด (consensus change) ทำให้การสร้างสายโกลบินชนิดบีตาต่ำลง ซึ่งพบใน β^+ thalassemia และชนิดที่พบในประเทศไทยคือ IVS-1 nt 5 (G-C) หรือเกิดจากการแทนที่เบสตำแหน่งอื่นๆของ intron (internal IVS change) ที่ทำให้เกิดจุดตัดขึ้นใหม่ภายใน intron เช่น IVS-2 nt 654 (C-T) เกิดจุดตัดขึ้นใหม่ทางด้าน 5' ทำให้เกิด β^+ thalassemia หรือเกิดการแทนที่เบสใน exon (mutation in exon) ที่ทำให้เกิดจุดตัดขึ้นใหม่ภายใน exon ส่วนใหญ่เป็น β^+ thalassemia เช่น Hb E (Codon 26, G-A) เป็นต้น [16]

จ. *polyadenylation mutation* เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง AATAAA การแทนที่เบสที่ตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดหายไปใน 6 ตัวของรหัสนี้ จะทำให้เกิด β^+ thalassemia

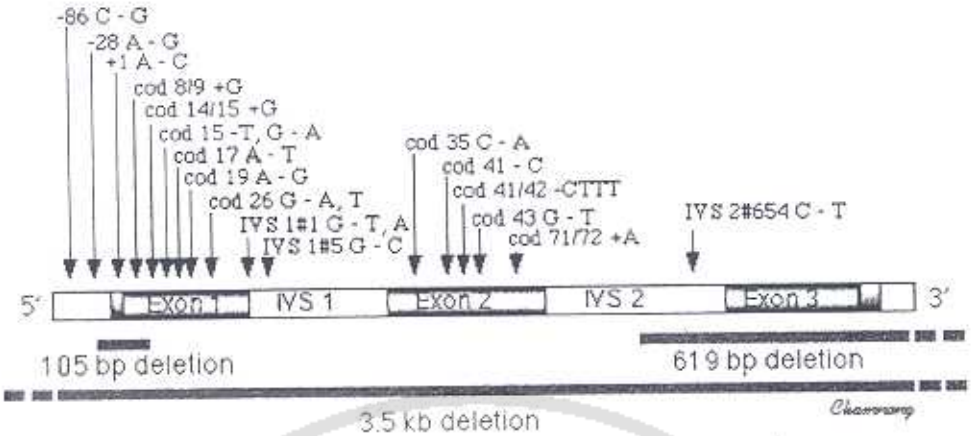
ฉ. *cap site mutation* เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดการแทนที่เบสที่ cap site พบชนิดเดียวในคนอินเดียและคนไทยภาคใต้คือการแทนที่เบส A ด้วย C เป็นชนิด β^+ thalassemia

ช. *การกลายพันธุ์ที่เกิดจากยีนขนาดใหญ่ขาดหายไป* ทำให้เกิด β^0 thalassemia เช่น ชนิดยีนขาดหายไป 619 เบส ทางด้าน 3' ของ β globin gene พบร้อยละ 30 ของ β thalassemic gene ในคนเผ่าซินที่อาศัยในประเทศอินเดียและปากีสถาน และเคยมีรายงานในประเทศไทยด้วย ชนิดยีนขาดหายไป 3485 เบส เป็นชนิดที่ β globin gene ทั้งหมดขาดหายไป พบในภาคใต้ได้บ่อยกว่าภาคอื่นๆ และชนิดยีนขาดหายไป 105 เบส ทางด้าน 5'

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ของ β globin gene ที่พบในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง (ND = not determined)[5,12,15,17]

ชนิดของกลายพันธุ์	ความถี่ (ร้อยละ)							
	ไทย				มาเลเซีย	พม่า	อินเดีย	จีน
	ใต้	กลาง	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ				
Codon 41/42 (TTCTTT->TT)	30.1	41.6	39.8	37.7	12.2	21.2	11.8	46.7
IVS 1#5 (G->C)	18.8	4.3	2.8	0	48.8	27.2	22.5	1.9
Codon 19 (AAC-AGC)	15.2	2.9	ND	0	14.6	0	0	0
Codon 17 (AAG->TAG)	11.2	16.5	39.8	29.5	2.4	7.1	0	17.6
IVS1#1 (G->T)	6	1.3	ND	1.6	7.3	34.3	13.7	0.5
-28 (A->G)	5.7	9.3	3.5	1.6	0	4	0	11.1
3.5 kb deletion	4.3	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IVS2#654 (C->T)	2.1	8	1.4	9.8	7.3	2	0	13.9
Codon 41 (-C)	1.4	0.8	ND	0	0	0	0	0
Codon 8/9 (AGTCT->AGGTCT)	0.4	0	0	0	0	0	19.6	0
105 bp deletion	0.4	0	0	0	0	0	0	
Codon 15 (TGG->TAG)	0.4	0	0	0	0	0	4.9	0
CAP site (A->C)	0.4	0	0	0	0	2	0	
IVS1#1 (G->A)	0.4	0	0	0	0	0	0	0
-88 (C-T)	0	0	0	0	0	0	2	0
-86 (C-G)	0	0.5	0	0	0	0	0	0
Cod 16 (-C)	0	0	0	0	0	0		0
Cod 35 (C->A)	0	2.7	0	0	0	0	0	0
Cod 35 (-C)	0	0	0	0	4.8	0	0	0
Ccd 71/72 (+A)	0	2.1	0	13.1	0	0	0	7.4
Cod 26 (G-T)	0	ND	0	1.6	0	0	0	0
619 bp deletion	0	1.1	0	0	0	0	20.5	0
Cod 43 (G-T)	0	0.8	0	0	0	0	0	0
Cod 15 (-T)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
Cod 14/15(+G)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
Uncharacterized	3.1	5.1	13.3	4.9	2.4	4.1	2	0.5
จำนวนอัลลีลที่ศึกษา	282	375	113	61	41	99	102	216

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY



ภาพที่ 5 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ของ β globin gene ที่พบในประเทศไทย[16]

เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวการสร้างสายโกลบินลดลง ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของธาลัสซีเมียชนิดบีตาตามความผิดปกติในการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีปริมาณการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาลดลงแต่ยังมีการสร้างได้บ้างเรียกว่า β^+ thalassemia และอีกชนิดไม่สามารถสร้างสายโกลบินชนิดบีตาได้เลยเรียกว่า β^0 thalassemia ในคนปกติมี β globin gene อยู่ 2 ยีนโดยมาจากพ่อและแม่อย่างละยีน โดยถ้าได้รับ β globin gene ที่มีความผิดปกติดังกล่าวมา จะทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง β globin gene ที่ผิดปกติซึ่งได้แก่ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง β^+ thalassemia กับ β^+ thalassemia(β^+/β^+) ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง β^0thalassemia กับ β^+ thalassemia (β^0/β^+) และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง β^0 thalassemia กับ β^0 thalassemia (β^0/β^0) โดยปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวเหล่านี้ทำให้เกิดธาลัสซีเมียชนิดบีตาได้หลายชนิด และมีอาการรุนแรงได้มากน้อยแตกต่างกัน จนถึงปัจจุบันมีรายงานแล้วทั่วโลกเกือบ 200 ชนิดและมี 24 ชนิดที่มีรายงานในประเทศไทย (ตารางที่2) ซึ่งธาลัสซีเมียชนิดบีตาดังกล่าวสามารถจำแนกตามกลุ่มอาการที่แสดงออกได้ดังนี้

1. β thalassemia minor (β thalassemia trait, heterozygous β^+ thalassemia) เกิดจากความผิดปกติในการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาข้างใดข้างหนึ่งเป็น β^+ thalassemia ในขณะที่อีกข้างปกติ (β^+ thalassemia/β normal) เป็นธาลัสซีเมียชนิดบีตาที่ไม่แสดงอาการใดๆ ปริมาณฮีโมโกลบินปกติหรือลดลงเพียงเล็กน้อย ในการวินิจฉัยผู้ป่วยกลุ่มนี้ต้องหาปริมาณ Hb A_2 กล่าวคือในผู้ป่วยกลุ่มนี้ Hb A_2 > ร้อยละ 3.5 (ปกติ Hb A_2 ร้อยละ 0-3.5) ทั้งนี้เนื่องมาจากว่า ใน β thalassemia minor จะมีการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาลดลง ทำให้มีสายโกลบินชนิดแอลฟาเกิน และสายโกลบินชนิดแอลฟาที่เกินมานี้จะไปจับกับสายโกลบินชนิดเดลตาและแกมมา ทำให้ในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีปริมาณ Hb A_2 และ Hb F ที่มากขึ้น ผู้ป่วยกลุ่มนี้เมื่อทำ Hb electrophoresis เพื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบิน

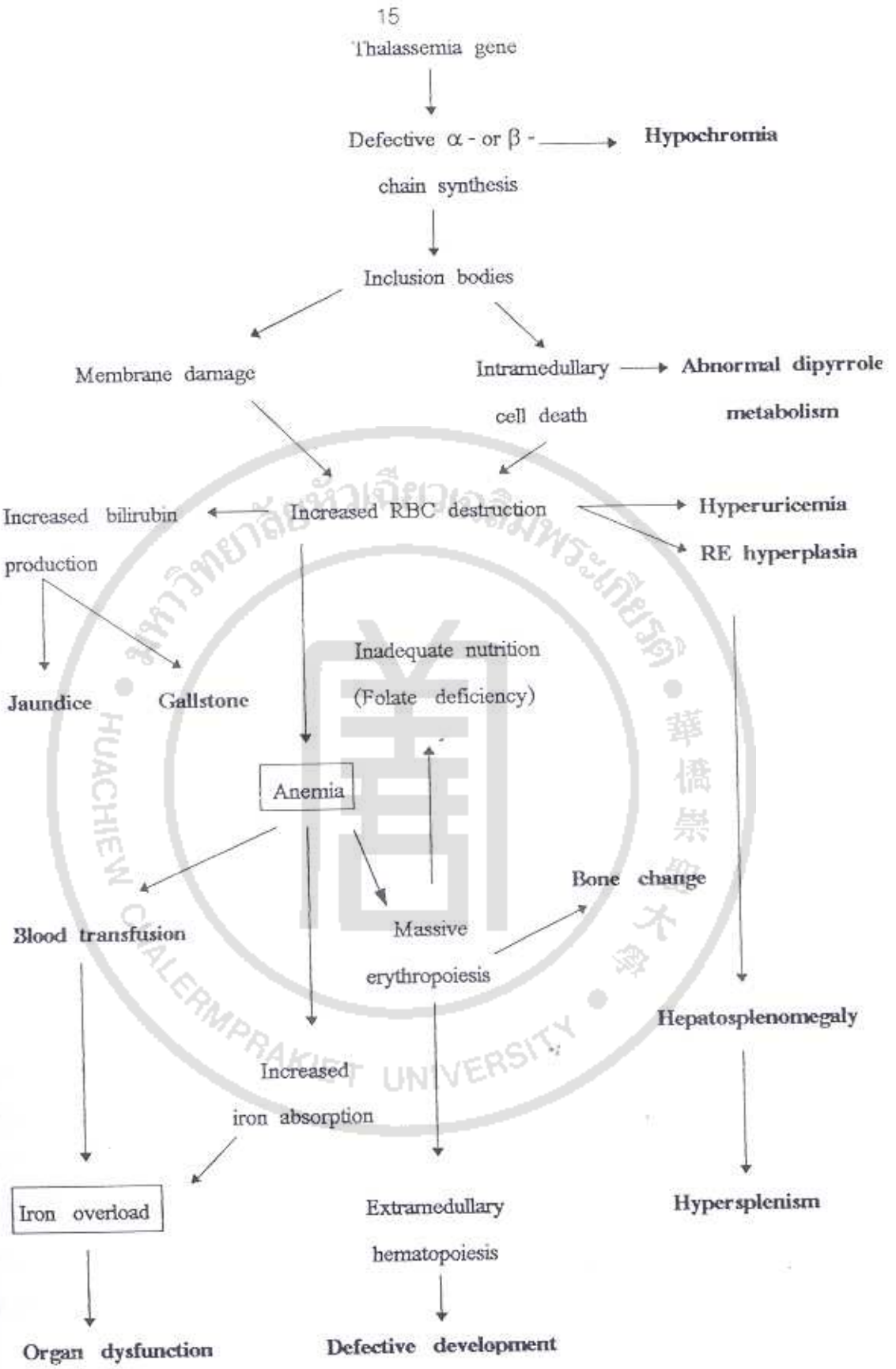
จะพบ Hb A และ Hb A_2 ส่วน Hb F แม้จะเพิ่มขึ้นมากกว่าในคนปกติแต่มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะตรวจวัดโดยวิธีนี้ได้

2. β thalassemia intermedia ได้แก่ homozygous β^+ thalassemia (β^+thalassemia/β^+thalassemia) และ heterozygous β^+ thalassemia with abnormal hemoglobin เช่น β^+ thalassemia/Hb E ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะเริ่มมีความผิดปกติทางโลหิตวิทยา เช่น ซีด MCV, MCH และ MCHC ลดลง ลักษณะเม็ดเลือดแดงมี poikilocytosis, anisocytosis ซึ่งความรุนแรงขึ้นกับระดับของความผิดปกติจากการสร้างสายโกลบินชนิดบีตา ผู้ป่วยกลุ่มนี้เมื่อทำ Hb electrophoresis เพื่อหาชนิดของฮีโมโกลบินจะพบทั้ง Hb A, Hb A_2, Hb F และ Hb E (ในกรณี β^+ thalassemia/Hb E) โดยปริมาณของ Hb A2 และ Hb F จะเพิ่มขึ้นมากกว่าใน β thalassemia minor

3. β thalassemia major ได้แก่ homozygous β^0 thalassemia (β^0 thalassemia /β^0 thalassemia), heterozygous β^0 thalassemia with abnormal hemoglobin เช่น β^0 thalassemia /Hb E ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ซีด MCV, MCH และ MCHC ต่ำ ลักษณะเม็ดเลือดแดงมี anisocytosis และ poikilocytosis ธาลัสซีเมียชนิดนี้จะมีการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาเพียงเล็กน้อย หรือไม่สร้างเลย ดังนั้นกลุ่มนี้เมื่อทำ Hb electrophoresis เพื่อหาชนิดของฮีโมโกลบินจะพบทั้ง Hb A ในปริมาณเพียงเล็กน้อยหรือไม่พบเลย Hb A2, Hb F พบในปริมาณที่มากขึ้น ส่วน Hb E จะพบในกรณี β^0 thalassemia/Hb E

2.3 <u>พยาธิสภาพของธาลัสซีเมีย (Pathology of thalassemia)</u>[21]

พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เกิดขึ้นเนื่องมาจากความไม่สมดุลย์ของสายโกลบินที่สร้างขึ้น กล่าวคือ ในธาลัสซีเมียชนิดบีตาซึ่งมีการสร้างสายโกลบินชนิดบีตาน้อยกว่าปกติ ทำให้มีสายโกลบินชนิดแอลฟาเกิน (excess α globin chains) ซึ่งสายโกลบินชนิดแอลฟาส่วนเกินนี้จะไปก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ตามมา โดยจะไปตกตะกอนที่ผนังเม็ดเลือดแดงบางส่วนจะถูกย่อยสลายภายในเม็ดเลือดแดง การย่อยสลายจะก่อให้เกิดการปลดปล่อย free oxygen redical ออกมาและทำให้เกิด lipid peroxidation ที่ผนังเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงจะมีความยืดหยุ่นน้อยลง (decrease deformability) ทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นลงและถูกทำลายโดยม้ามในที่สุด ถ้าเกิดในเม็ดเลือดตัวอ่อนการทำลายจะเกิดขึ้นในไขกระดูก ทำให้เกิด ineffective erythropoiesis เนื่องจากเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนถูกทำลายในไขกระดูกมากกว่าปกติ ทำให้มีเม็ดเลือดแดงที่จะออกสู่กระแสเลือดมีน้อย ดังนั้นผู้ป่วยธาลัสซีเมียจึงมีอาการซีด เหลือง ตับโต ม้ามโต เมื่อซีดมากไขกระดูกต้องสร้างเม็ดเลือดเพิ่มขึ้นเพื่อชดเชย ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระดูก เช่นทำให้โครงสร้างของใบหน้าผิดรูปไป การเจริญเติบโตไม่สมอายุ และมีภาวะเหล็กเกินสะสมอยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ



ภาพที่ 6 แสดงพยาธิสภาพที่เกิดจากธาลัสซีเมีย[9]

2.4 การวินิจฉัยธาลัสซีเมียทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากธาลัสซีเมียที่เกิดขึ้นมีหลายชนิด บางชนิดก็แสดงอาการและบางชนิดก็ไม่แสดงอาการ ดังนั้นในกลุ่มที่ไม่แสดงอาการจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ผลทางห้องปฏิบัติการมาช่วยในการวินิจฉัย ในการวินิจฉัยโรคเลือดนั้นเริ่มตั้งแต่การซักประวัติ ตรวจร่างกายไปจนกระทั่งถึงการใช้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัยธาลัสซีเมียแบ่งออกเป็น 2 ระดับคือ การตรวจกรอง (screening method) การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน (standard method)

2.4.1 การตรวจกรอง (screening method)

การตรวจกรองเป็นการตรวจเพื่อแยกคนที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียออกจากคนปกติ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วการตรวจกรองจะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกเหมาะสำหรับการใช้ตรวจในกลุ่มประชากรจำนวนมากๆ (mass screening)เพื่อลดจำนวนที่จะต้องทำการตรวจโดยวิธีมาตรฐานหรือการตรวจยืนยัน แต่ถึงอย่างไรก็ตามความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจกรองนั้นก็ยังน้อยกว่าวิธีมาตรฐานและวิธีการตรวจยืนยัน การตรวจกรองที่กล่าวถึงนี้ได้แก่

- examination of peripheral blood smear
- determination of inclusion body
- dichorophenol - indophenol (DCIP) precipitation test
- one tube osmotic fragility test

2.4.1.1 examination of peripheral blood smear

ในการทำ CBC การรายงาน red cell morphology เป็นสิ่งที่ต้องทำอยู่แล้วซึ่งเป็นการตรวจกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติอย่างหนึ่ง ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถแยกชนิดของธาลัสซีเมียได้อย่างเด่นชัดก็ตาม แต่ในธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ red cell morphology อาจจะพบได้ตั้งแต่ไม่แตกต่างจากคนปกติไปจนกระทั่งมีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับคนปกติ ซึ่งความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงที่พบได้แก่ poikilocytosis , anisocytosis , microcytosis , hypochromic red cell ,fragmented red cell ในบางภาวะอาจพบ polychromasia, nucleated red blood cell (NRBC), target cells หรือ basophilic stippling ร่วมด้วย

2.4.1.2 inclusion bodies

inclusion bodies เกิดจากการตกตะกอนของสายโกลบินที่เสียสภาพ ซึ่งอาจเกิดจากการขาดเอ็นไซม์บางชนิดของเม็ดเลือดแดงหรือฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร (unstable hemoglobin) ลักษณะของ inclusion ที่พบมี 2 ลักษณะคือ Hb H inclusion body เป็น inclusion ที่เกิดจาก Hb

H ซึ่งลักษณะของ inclusion ที่เกิดเนื่องจาก Hb H จะพบได้ในสภาวะที่ Hb H ทำปฏิกิริยากับ redox dye เช่น brilliant cresyl blue (BCB) จะเกิดการตกตะกอนของ Hb H เป็นเม็ดเล็ก ๆ อยู่ภายในเม็ดเลือดแดงมีลักษณะคล้ายลูกกอล์ฟ (golf ball) และอีกลักษณะหนึ่งคือ heinz body ซึ่งเป็น inclusion ที่เกิดจากการตกตะกอนของฮีโมโกลบินที่เสียสภาพเนื่องจากอิทธิพลของยาหรือสารเคมีบางชนิด เช่น chlorates, phenylhydrazine หรือเกิดจากภาวะพร่องของเอ็นไซม์ในเม็ดเลือดแดง เช่น ภาวะพร่องเอ็นไซม์ G6PD หรืออาจเกิดจากฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร โดยเมื่อย้อมด้วย supra vital stain เช่น crystal violet, methyl violet หรือ BCB จะพบการตกตะกอนของ Hb เป็นจุดกลมขนาด 1-4 μm ติดสีน้ำเงินเข้มอยู่ชิดผนังเม็ดเลือดแดงด้านใดด้านหนึ่ง

2.4.1.3 Dichorophenol indophenol (DCIP) precipitation test

เป็นการทดสอบที่ใช้ในการตรวจกรองหา Hb E และฮีโมโกลบินไม่เสถียรชนิดต่างๆ โดยอาศัยหลักการที่ว่า Hb E ($\alpha_2\beta_2^{26Glu\rightarrow Lys}$) เป็นฮีโมโกลบินที่มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่าง $\alpha_2\beta_2$ ลดลงกว่าฮีโมโกลบินปกติ ฮีโมโกลบินที่ควรจะอยู่ในรูป tetramer หลุดออกมาอยู่ในรูป Monomer ซึ่งในสภาวะที่ฮีโมโกลบินที่อยู่ในรูป monomer นี้จะทำให้เกิด free –SH group ซึ่งจะถูก oxidize โดย DCIP ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของฮีโมโกลบินเหล่านั้น

2.4.1.4 one tube osmotic fragility

one tube osmotic fragility เป็นการวัดความทนของเม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ในสภาวะ hypotonic solution โดยปกติเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสภาวะ isotonic solution จะมีรูปร่างเป็น Biconcave แต่เมื่อเม็ดเลือดแดงเหล่านี้อยู่ในสภาวะ hypotonic solution น้ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงบวมขึ้นและแตกในที่สุด ปัจจัยที่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงคืออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิว (surface area) กับสารที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแดง (internal red cell content) ซึ่งส่วนใหญ่ก็คือฮีโมโกลบิน ดังนั้นเม็ดเลือดแดงในธาลัสซีเมียที่มีการสร้างฮีโมโกลบินลดลงทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยกว่าปกติ จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของ NaCl ที่ร้อยละ 0.36 (W/V) สามารถแยกคนปกติออกจากธาลัสซีเมียได้ในระดับหนึ่ง โดยเม็ดเลือดแดงของคนปกติที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะแตกประมาณร้อยละ 90 – 100 ในขณะที่ธาลัสซีเมียการแตกของเม็ดเลือดแดงจะน้อยกว่านี้ ได้มีผู้ศึกษาถึงความไว (Sensitivity) และความจำเพาะของการทดสอบนี้พบว่าประมาณร้อยละ 91.0 และ 91.7 ตามลำดับ [22]

2.4.2 การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน

การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน เป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยธาลัสซีเมีย การตรวจโดยวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะมากกว่าการตรวจกรอง แต่ขั้นตอนและวิธีการทำยุ่งยากกว่า การตรวจโดยวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ได้แก่

- red blood cell parameters
- Hb electrophoresis
- quantitation of Hb F
- quantitation of Hb A_2
- globin chain ratio
- DNA analysis

2.4.2.1 Red blood cell parameters

red blood cell parameters ที่ใช้ในการวินิจฉัยธาลัสซีเมียทางห้องปฏิบัติการได้แก่

hemoglobin (Hb) เป็นค่าที่บอกปริมาณของฮีโมโกลบิน มีหน่วยเป็นกรัม/เดซิลิตร (g/dl) ค่าปกติประมาณ 14-16 กรัม/เดซิลิตร ในผู้ชาย และ 13-15 กรัม/เดซิลิตร ในผู้หญิง ส่วนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินจะลดลงโดยปริมาณที่ลดลงจะขึ้นกับความรุนแรงของโรคธาลัสซีเมีย

red blood cell count (RBC count) เป็นค่าที่บอกปริมาณเม็ดเลือดแดงต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร มีหน่วยเป็น เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร (cell/mm^3) ค่าปกติของผู้ชายและผู้หญิงจะมีค่าเท่ากับ 4.2-5.4 x10^6 และ 3.6-5.0 x10^6 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียค่า RBC count จะลดลงเช่นเดียวกับค่า Hb

hematocrit (Hct) เป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาตรเม็ดเลือดแดงเมื่อเทียบกับปริมาตรเลือดทั้งหมด มีหน่วยเป็นร้อยละ ค่าปกติในผู้ชายและผู้หญิงจะมีค่าเท่ากับร้อยละ 41-48 และ 35-45 ตามลำดับ ส่วนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียค่า Hct จะลดลงเช่นเดียวกับ Hb และ RBC count ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างฮีโมโกลบินลดลง

mean corpuscular volume (MCV) เป็นค่าเฉลี่ยปริมาตรเม็ดเลือดแดง ค่านี้ได้จากการคำนวณระหว่าง Hct และ RBC count ค่าปกติอยู่ในช่วง 82-92 fl โดยมีสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ MCV = (Hct / RBC count)x10 มีหน่วยเป็น famtoliter (fl)

mean corpuscular hemoglobin (MCH) เป็นค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินเมื่อเทียบกับจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่านี้ได้จากการคำนวณระหว่าง Hb และ RBC count ค่าปกติอยู่ในช่วง 27-33 pg โดยมีสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ MCH = (Hb / RBC count)x10 มีหน่วยเป็น picogram (pg)

mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) เป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดง ค่านี้ได้จากการคำนวณระหว่าง Hb และ Hct ค่าปกติอยู่ในช่วง 31-35 g/dl โดยมีสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ MCHC = (Hb / Hct)x 100 มีหน่วยเป็น g/dl

red blood cell distribution width (RDW) เป็นค่าที่บอกความผันแปรเกี่ยวกับขนาดของเม็ดเลือดแดง เป็นค่าที่ได้มาจากการคำนวณความแปรปรวนของปริมาตรเม็ดเลือดแดง

2.4.2.2 hemoglobin electrophoresis

เป็นการทดสอบเพื่อดูชนิดของฮีโมโกลบิน โดยอาศัยหลักการที่ว่าฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมีลำดับและจำนวนกรดอะมิโนในสายโกลบินที่ต่างกัน ทำให้ฮีโมโกลบินเหล่านั้นมีประจุและขนาดที่ต่างกันจึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน จากการศึกษาพบว่าฮีโมโกลบินแต่จะชนิดจะมีอัตราเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากมากไปหาน้อยเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ Hb H, Hb Bart's, Hb A, Hb F, Hb A_2(E) และ Hb CS สำหรับ Hb E และ Hb A_2 เคลื่อนที่ในอัตราเร็วที่เท่ากันจึงไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินทั้งสองชนิดออกจากกันได้ด้วยวิธีนี้

2.4.2.3 quantitation of Hb A_2

หมายถึงการทดสอบเพื่อหาปริมาณของ Hb A_2 ซึ่งมีความสำคัญในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับธาลัสซีเมียชนิดบีตา โดย Hb A_2 ของธาลัสซีเมียชนิดนี้จะมีค่ามากกว่าร้อยละ 3.5 (คนปกติมี Hb A_2 ไม่เกินร้อยละ 3.5) โดยวิธีที่นิยมใช้ในการในการหาปริมาณ Hb A_2 คือ microcolumn chromatography อาศัยหลักการ anionic chromatography ซึ่ง Hb Eและ Hb A_2 จะมีความแรงของประจุน้อยกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่น จึงผ่าน Column ที่มี diethylaminoethyl (DEAE) เป็น stationary phase ได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่น

2.4.2.4 quantitation of Hb F

หมายถึงการทดสอบเพื่อหาปริมาณ Hb F ซึ่งมีความสำคัญในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับธาลัสซีเมียชนิดบีตาเช่นเดียวกับ Hb A_2 วิธีที่ใช้ในการหาปริมาณ Hb Fคือ alkali denaturation โดยอาศัยหลักการการทนต่อการเสียสภาพ (denature) ของฮีโมโกลบินในสภาวะที่เป็นกรดและด่างได้มากกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่น ปริมาณของ Hb F และ Hb A_2 ในธาลัสซีเมียชนิดบีตาพบว่าจะเพิ่มขึ้นตามความรุนแรงของโรค ทั้งนี้เพราะในในธาลัสซีเมียชนิดบีตา ปริมาณของสายโกลบินชนิดบีตาจะลดลงทำให้ Hb A ลดลง ร่างกายจึงพยายามเพิ่มการสร้าง Hb F และ Hb A_2 เพื่อทดแทนภาวะดังกล่าว

2.4.2.5 globin chain ratio

เป็นการทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างสายโกลบินชนิดแอลฟากับสายโกลบินชนิดบีตาเพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค ในธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาที่การสร้างสายโกลบินชนิดแอลฟาลดลง อัตราส่วนนี้จะลดลง ในทางตรงกันข้ามธาลัสซีเมียชนิดบีตาที่การสร้างสายโกลบินชนิดบีตาลดลง อัตราส่วนนี้จะสูงขึ้น อัตราส่วนดังกล่าวนี้มักจะใช้ในการพยากรณ์การดำเนินไปของโรคมากกว่าการวินิจฉัยเพื่อหาชนิดของธาลัสซีเมีย

2.4.2.6 DNA analysis

เป็นการทดสอบเพื่อช่วยในการวินิจฉัยพาหะของธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะการวินิจฉัย α thalassemia 2 trait และ α thalassemia 1 trait ในผู้ใหญ่ซึ่งไม่สามารถที่จะวินิจฉัยได้โดยวิธีอื่น เทคนิค DNA analysis ที่นิยมใช้กันเป็นอันดับแรกคือ polymerase chain reaction (PCR) โดยเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนที่ต้องการศึกษาให้มากขึ้นก่อนที่จะนำไปทำการศึกษาด้วยวิธีต่างๆ เช่น restriction fragment length polymoroism (RFLP) ซึ่งเป็นการหายีนที่มีความผิดปกติในลำดับเบส โดยใช้เอ็นไซม์ไปตัดที่จุดจำเพาะกับเบสที่มักจะเกิดความผิดปกติ ถ้าเบสที่ตำแหน่งนั้นมีเปลี่ยนไปเอ็นไซม์ก็ไม่สามารถตัดได้ ทำให้ขนาดของเบสนั้นยาวกว่าปกติ เป็นต้น [23]

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY