

บทที่ 2

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Review of Literatures)

2.1. ภาวะโลหิตจาง (anemia) หรือเลือดจาง

(อานนท์ บุญยรัตเวช, 2535; ถนอมศรี ศรีชัยกุล และคณะ, 2529; Wintrobe et al., 1993)

เป็นภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดแดงในร่างกายลดน้อยลง ผู้ที่มีอาการโลหิตจางจะมีอาการซีด เพลีย เหนื่อยง่าย ทำงานไม่ไหว ผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจางรุนแรงอาจมีอาการทำงานของหัวใจล้มเหลว เกิดภาวะหัวใจวาย สมองทำงานช้าลงจนกระทั่งหมดสติได้ สาเหตุของโลหิตจางมีหลายชนิด แบ่งได้ เป็น 2 กลุ่ม

1) การสร้างเม็ดเลือดแดงน้อยลง อาจเกิดจากการขาดสารอาหารที่จำเป็นในการสร้างเม็ดเลือดแดง เช่น ขาดธาตุเหล็ก โฟเลต (folate) วิตามินบี 12 โรคไขกระดูกฝ่อ (aplastic anemia) โรคที่มีเซลล์มะเร็งในไขกระดูก ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) เป็นต้น

2) การสูญเสียเม็ดเลือดแดงจากกระแสเลือด ได้แก่ การเสียเลือดทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง หรือการที่เม็ดเลือดแดงแตก หรือถูกทำลายไปเร็วกว่าปกติ เช่น ภาวะร่างกายต้านเม็ดเลือดแดงตนเอง (autoimmune hemolytic anemia) โรคโลหิตจางจากกรรมพันธุ์ เช่น โรคเม็ดเลือดแดงขาดเอนไซม์ (G6PD deficiency) โรคธาลัสซีเมีย เป็นต้น

อาจกล่าวได้ว่าโลหิตจางเป็นภาวะที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ เป็นการแสดงออกที่เกิดจากความผิดปกติ หรือมีสาเหตุจากโรคใดโรคหนึ่งจนมีอาการโลหิตจางแสดงให้เห็น ดังนั้นการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโลหิตจางเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอกับการรักษา จำเป็นต้องหาสาเหตุของโลหิตจางนั้นด้วยจึงจะทำให้การรักษานั้นมีประสิทธิภาพเนื่องจากได้ทำการรักษาที่ต้นเหตุอย่างแท้จริง

ภาวะที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ คือการมีระดับความเข้มข้นของ hemoglobin และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ที่ต่ำกว่าปกติจึงมีผลทำให้ร่างกายลดประสิทธิภาพการนำออกซิเจนไปสู่เซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย ในทางห้องปฏิบัติการจะระบุว่าเป็นโลหิตจางโดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของ hemoglobin และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น มีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ยที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 2 หรือมีค่าต่ำกว่าปกติที่กำหนดไว้ (mean-2SD)

อย่างไรก็ตามบางภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณเม็ดเลือดแดง (red cell mass) ต่อปริมาณพลาสมาในกระแสเลือด (plasma volume) จะทำให้ค่าบ่งชี้ที่ใช้อยู่ นั้นคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง เช่น ผู้ป่วยที่มีภาวะ hemodilution ทำให้ตรวจพบจำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณ hemoglobin และ hematocrit ต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่งเรียกภาวะนี้ว่า relative anemia

2.2. กลไกการเกิดภาวะโลหิตจาง

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะโลหิตจางมีอยู่ 2 ประการ คือ

- 1) การสร้างเม็ดเลือดแดง (red cell production)
- 2) การทำลายเม็ดเลือดแดง (red cell destruction) และการเสียเลือด (blood loss)

ตราบใดที่สมดุลระหว่างการสร้าง และการทำลาย หรือการเสียเลือด ยังคงมีอยู่ภาวะโลหิตจางก็จะไม่เกิดขึ้น ดังนั้นโลหิตจางจะเกิดขึ้นได้เมื่อ

ประการแรก มีการสูญเสียเม็ดเลือดแดงจากการมีเลือดออก หรือมีการทำลายเม็ดเลือดแดง ในอัตราที่สูงกว่าความสามารถที่ไขกระดูกจะผลิตเม็ดเลือดแดงออกมาชดเชยได้ การทำลายเม็ดเลือดแดงในอัตราที่สูงกว่าปกติอาจเนื่องมาจากความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง ได้แก่ ความผิดปกติในปริมาณ และชนิดของ hemoglobin ความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์ เอนไซม์ หรือพลังงานภายในเซลล์

ประการที่สอง เกิดจากการเสื่อมสภาพ หรือความผิดปกติในการผลิตเม็ดเลือดแดงในไขกระดูกทำให้สร้างเม็ดเลือดแดงได้น้อยลง

2.3. การปรับสภาพในผู้ป่วยโลหิตจาง

การแสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วยโลหิตจางเกิดจากประสิทธิภาพการนำออกซิเจนไปสู่เซลล์ และเนื้อเยื่อลดลง เป็นเหตุให้เซลล์และเนื้อเยื่อนั้นขาดออกซิเจน เพื่อนำมาใช้ในขบวนการ metabolism เมื่อเกิดภาวะโลหิตจางร่างกายต้องปรับเปลี่ยนการทำงาน เพื่อให้การไหลเวียนเลือด และออกซิเจนเป็นไปอย่างทั่วถึงโดย

1) ลดการใช้ ออกซิเจน เพื่อชดเชยกับการได้รับปริมาณออกซิเจนในเลือดน้อย ซึ่งการชดเชยแบบนี้ยังไม่เด่นชัดนัก

2) ลด affinity ของฮีโมโกลบินต่อออกซิเจน คือฮีโมโกลบินปล่อยออกซิเจนให้กับเซลล์ได้ง่ายขึ้น เป็นการปรับตัวในระยะแรกของภาวะโลหิตจาง โดยโมเลกุลของฮีโมโกลบินจะปรับตัวให้มีการปล่อยออกซิเจนได้ง่ายกว่าปกติโดยใช้ 2,3 diphosphoglycerate (2,3-DPG)

3) ปรับการไหลเวียนของเลือดไปสู่อวัยวะที่สำคัญให้มากขึ้น อวัยวะบางอย่างไวต่อการขาดออกซิเจน เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ สมอง โดยลดการไหลเวียนเลือดในอวัยวะที่มีความสำคัญน้อย หรือทนต่อการขาดออกซิเจน ได้แก่ บริเวณผิวหนัง และไต

4) เพิ่มการสูบฉีดเลือดจากหัวใจ เป็นวิธีที่ดีมากเพราะเมื่อมีการไหลเวียนของเลือดเร็วขึ้น เซลล์ต่างๆก็จะได้รับออกซิเจนเพิ่มขึ้น การเพิ่มการทำงานของหัวใจจะเกิดขึ้นเมื่อระดับของฮีโมโกลบินของผู้ป่วยลดต่ำกว่า 7 g/dl

5) เพิ่มอัตราการสร้างเม็ดเลือดแดง เป็นวิธีที่ดีที่สุดของร่างกาย พบว่าผู้ป่วยโลหิตจางส่วนมากจะมีการหลั่งฮอร์โมน erythropoietin เพิ่มขึ้น การเร่งการผลิตเม็ดเลือดแดงเป็นผลทำให้เม็ดเลือดแดงออกสู่กระแสเลือดเร็วขึ้น ซึ่งทำให้สามารถพบเม็ดเลือดแดงชนิด reticulocyte (หรือ polychromasia) และเม็ดเลือดแดงที่มี nucleus ออกมาในกระแสเลือดได้

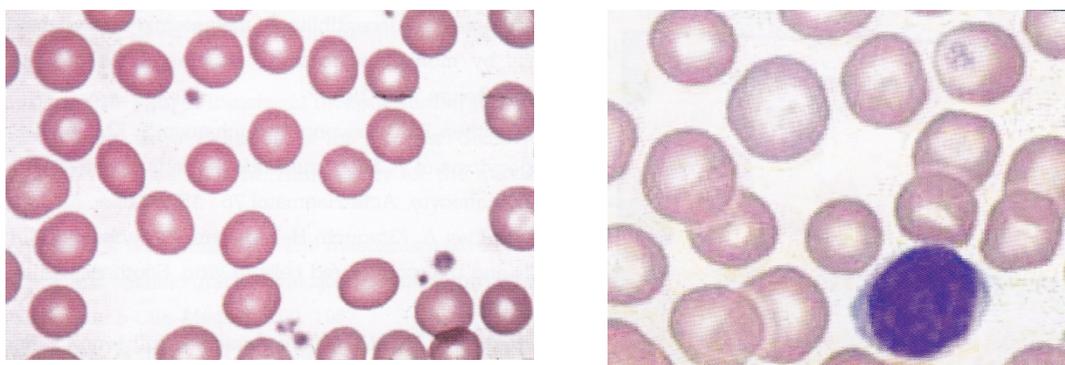
2.4. การแบ่งชนิดโลหิตจาง

การแบ่งชนิดโลหิตจางแบ่งได้ 2 วิธี คือ

2.4.1. การแบ่งชนิดโลหิตจางโดยอาศัยลักษณะสีฐานของเม็ดเลือดแดง (morphologic classification) เป็นการแบ่งชนิดของโลหิตจางโดยอาศัยประเด็นหลัก คือ

1) ขนาดของเม็ดเลือดแดง โดยประมาณขนาดจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือการวัดขนาดหรือปริมาตรเซลล์โดยตรงจากเครื่องนับเม็ดเลือด โดยดูที่ค่า mean corpuscular volume (MCV)

2) ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง จากความเข้มของการติดสีโดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 2.1) หรือวัดโดยตรงจากเครื่องนับเม็ดเลือด โดยดูที่ค่า mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)



รูปที่ 2.1 เปรียบเทียบการติดสีระหว่างเม็ดเลือดแดงปกติ (ซ้าย) และเม็ดเลือดแดงที่ติดสีจาง (ขวา) (ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี, 2549)

จากประเด็นหลักดังกล่าว ทำให้สามารถแบ่งโลหิตจางตามลักษณะสีฐานของเม็ดเลือดแดง ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มก็ยังสามารถจำแนกย่อยได้เป็นชนิดและสาเหตุของโลหิตจางได้ดังนี้

2.4.1.1. กลุ่มที่มีเม็ดเลือดแดงขนาดใหญ่ติดสีปกติ เรียกว่า macrocytic (normochromic) anemia มี MCV สูง และ MCHC ปกติ พบในผู้ป่วยที่มี

- 1) ภาวะพร่องวิตามินบี 12 และภาวะพร่องกรดโฟลิก (folic acid)
- 2) โรคตับ

2.4.1.2. กลุ่มที่มีเม็ดเลือดแดงขนาดเล็กติดสีจางเนื่องจากปริมาณและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงน้อยเรียกว่า microcytic hypochromic anemia มี MCV, MCH และ MCHC ลดลง พบในผู้ป่วยที่มี

- 1) โลหิตจางจากการขาดเหล็ก (iron deficiency anemia)
- 2) โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia)
- 3) Sideroblastic anemia

2.4.1.3. กลุ่มที่มีเม็ดเลือดแดงทั้งขนาดและการติดสีปกติ แต่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยลงจึงทำให้ระดับฮีมาโตคริต และฮีโมโกลบินต่ำลง เรียกกลุ่มนี้ว่า normocytic normochromic anemia มี MCV, MCH และ MCHC ปกติ พบในผู้ป่วยที่มี

- 1) Hemoglobinopathies
- 2) Immune hemolytic anemia
- 3) Aplastic และ hypoplastic anemia
- 4) โรคเกี่ยวกับไตที่มีผลทำให้ระดับฮอร์โมน erythropoietin ต่ำ
- 5) การอักเสบ (Inflammation)
- 6) ไชกระดูกถูกแทนที่ด้วยเซลล์มะเร็ง หรือมี fibrosis

การพิจารณาผลจากเครื่องมือนับเม็ดเลือด คือ MCV, MCH และ MCHC ควรทำควบคู่กับการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากค่าดัชนีทั้งสามเป็นค่าเฉลี่ยจากเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่ถูกนับ ซึ่งถ้ามีเม็ดเลือดแดงผิดปกติในลักษณะของ anisocytosis ก็อาจจะทำให้ค่า MCV ปกติได้ จึงดูเสมีร์เลือดประกอบกันไป อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีค่าจากเครื่องมือนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติออกมา คือ ค่าความกว้างของการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดต่างกัน เรียกว่า red cell distribution width (RDW) โดยนำเม็ดเลือดแดงทุกเซลล์มาจัดเป็นฮิสโตแกรม (histogram) ตามขนาดของเซลล์ ฮิสโตแกรมที่กว้างมากจะได้ค่า RDW สูง ซึ่งเป็นการแสดงภาวะ anisocytosis

จากค่า MCV และ RDW จะทำให้แยกภาวะโลหิตจางได้ดังนี้

2.4.1.4. Microcytic anemia ได้แก่

- 1) กลุ่ม MCV ต่ำ RDW ปกติ ได้แก่
 - α -thalassemia trait
 - β -thalassemia trait
 - Hb E trait
- 2) กลุ่ม MCV ต่ำ RDW สูง ได้แก่
 - โลหิตจางจากการขาดเหล็ก
 - Thalassemia ชนิดปานกลาง และรุนแรง

2.4.1.5. Normocytic anemia ได้แก่

- 1) กลุ่ม MCV ปกติ RDW ปกติ ได้แก่
 - ภาวะเลือดออกเฉียบพลัน (acute bleeding)
 - โรคตับ
 - Chronic leukemia
- 2) กลุ่ม MCV ต่ำ RDW สูง ได้แก่
 - Disseminated intravascular coagulation (DIC)
 - Acute lymphoblastic leukemia
 - Hereditary spherocytosis
 - Sideroblastic anemia

- Myelofibrosis
- Immune hemolytic anemia

2.4.1.6. Macrocytic anemia ได้แก่

- 1) กลุ่ม MCV สูง RDW ปกติ ได้แก่

- Acquired aplastic anemia

- 2) กลุ่ม MCV ต่ำ RDW สูง ได้แก่

- Immune hemolytic anemia ที่มี reticulocyte สูง

- Hemolytic disease of the newborn

- ภาวะขาดวิตามินบี 12 หรือกรดโฟลิก

- Acute lymphoblastic leukemia ในขณะที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรือ

หลังการปลูกถ่ายไขกระดูก

- Chronic lymphocytic anemia

- โรคไขกระดูกฝ่อจากกรรมพันธุ์ (primary aplastic anemia)

2.4.2. การแบ่งชนิดโลหิตจางโดยอาศัยลักษณะทางพยาธิสรีระวิทยา (pathophysiologic classification) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ดังนี้

2.4.2.1. การสร้างเม็ดเลือดแดงได้น้อย แบ่งเป็น 3 สาเหตุ

1) ปัญหาไขกระดูกที่เป็นแหล่งสร้างเม็ดเลือดแดง ได้แก่ โรคหรือภาวะที่มีความผิดปกติที่ไขกระดูก เช่น aplastic anemia ซึ่งเมื่อเจาะไขกระดูกจะพบว่ามี hypocellularity ของเซลล์ทั้งสามสาย

2) ปัญหาเรื่องการขาดแคลนวัตถุดิบที่จะมาสร้างเม็ดเลือดแดง ได้แก่ ภาวะขาดเหล็กเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบิน ส่วนวิตามินบี 12 เป็นส่วนประกอบสำคัญในการเจริญของนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน

- 3) ปัญหาเกี่ยวกับฮอร์โมนที่ควบคุมการสร้างเม็ดเลือดแดง คือ erythropoietin

2.4.2.2. มีการทำลายเม็ดเลือดแดงมากผิดปกติ คือภาวะที่เรียกว่า hemolytic anemia แบ่งได้ออกเป็น 2 ชนิด คือ

1) ชนิดที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง เรียกว่า intracorpuscular defect ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นมาแต่กำเนิด หรือ congenital hemolytic anemia ได้แก่ ภาวะหรือโรคต่อไปนี้

- ความผิดปกติที่เยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis (ovalocytosis) และ hereditary pyropoikilocytosis

- โรคที่มีความผิดปกติที่ hemoglobin ได้แก่ hemoglobinopathies และ thalassemia

- โรคที่มีความผิดปกติของเอนไซม์ ที่พบบ่อย คือ G-6-PD deficiency

- โรค paroxysmal nocturnal hemoglobinuria เป็นโรคเดียวที่เกิดภายหลัง (acquired disorder)

2) ชนิดที่มีความผิดปกติภายนอกเม็ดเลือดแดง เรียกว่า extracorpuscular defect จัดเป็น acquired hemolytic anemia แบ่งได้เป็น

- Acquired non-immune hemolytic anemia ส่วนใหญ่เกิดจากภาวะที่มีพยาธิสภาพที่เส้นเลือดเล็กๆ ทำให้เม็ดเลือดแดงที่ผ่านหลอดเลือดดังกล่าวถูกกระแทกแตก และมีการแตกของเม็ดเลือดแดงเกิดขึ้น เรียกภาวะนี้ว่า microangiopathic hemolytic anemia (MAHA) ภาวะอื่นๆที่อาจพบได้ เช่น ภาวะม้ามโต การได้รับยาหรือสารเคมี การติดเชื้อ ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้

- Acquired immune hemolytic anemia แบ่งได้เป็น autoimmune hemolytic anemia (AIHA) และ isoimmune hemolytic anemia ที่เกิดจากการได้รับเลือดผิดหมู่ หรือเกิดจากแม่กับลูกที่มีหมู่เลือดไม่ตรงกัน (hemolytic disease of newborn)

3) การสูญเสียเลือด แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- การเสียเลือดแบบเฉียบพลัน (acute blood loss)

- การเสียเลือดแบบเรื้อรัง (chronic blood loss)

2.5. การวินิจฉัยภาวะโลหิตจาง

การวินิจฉัยโลหิตจางทำได้ 3 ประการ คือ

2.5.1. จากอาการ ส่วนใหญ่เกิดจากการขาดออกซิเจนไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ซึ่งระบบที่กระทบกระเทือนที่สุด ได้แก่ ระบบประสาทที่มีเส้นเลือดฝอยมาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก ทำให้ผู้ป่วยมีอาการหน้ามืด เวียนศีรษะ เป็นลมบ่อยๆ รองลงมาคือ ระบบหัวใจ ทำให้มีอาการเหนื่อย โดยอาการเกิดมากขึ้นเรื่อยๆ ใกล้เคียงกับปัจจัยหลายอย่างรวมกัน คือ

- ระดับความรุนแรงของ anemia

- ปัจจัยของแต่ละบุคคล เช่น อายุ

- ระยะเวลาของการเกิด anemia หากผู้ป่วยมีการเกิด anemia แบบช้าๆ ร่างกายจะปรับสภาพได้ค่อนข้างมาก อาการก็ไม่รุนแรงมาก หากเกิด anemia อย่างรวดเร็ว ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรงมากจนช็อกได้ ถ้าปริมาณเลือดในร่างกายลดลงอย่างรวดเร็ว

2.5.2. จากการตรวจร่างกาย โดยดูสีของ mucous membrane, sclera และเล็บ ว่าเป็นสีชมพูหรือไม่ ในรายที่ผู้ป่วยซีด ตำแหน่งดังกล่าวจะมีสีจางลง

2.5.3. จากห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยระดับฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต red cell count และการหาค่า red cell indices

โดยทั่วไปแล้วเมื่อตรวจพบว่าผู้ป่วยมีภาวะโลหิตจาง จะต้องวินิจฉัยสาเหตุของภาวะโลหิตจางนั้น ซึ่งจำเป็นต้องใช้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย

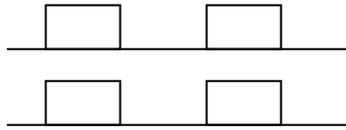
2.6. โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) และ hemoglobinopathies

(ถนอมศรี ศรีชัยกุล, 2535; ปราณี พุเจริญ, 2536; Rodak, 2002)

2.6.1. ธาลัสซีเมีย หมายถึง ภาวะที่มีอัตราการสร้าง globin chain สายใดสายหนึ่งลดลง ทำให้เกิดความไม่สมดุลของสาย globin chain ที่เป็นคู่กันอยู่ ดังนั้น globin chain ที่เหลือจึงจับกลุ่มกันเองเกิดเป็นตะกอน หรือ inclusion ภายในเซลล์ การที่มีอัตราการสร้าง globin chain สายใดสายหนึ่งลดลงนั้น จัดเป็นความผิดปกติด้านปริมาณ (quantitative disorders) ของการสร้าง globin chain ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ globin gene

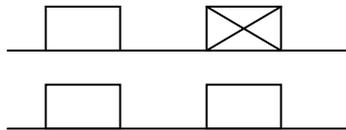
ธาลัสซีเมีย แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามชนิดของ globin chain ที่ผิดปกติ คือ α และ β thalassemia

2.6.1.1. α -thalassemia เกิดจากความผิดปกติของ α -globin gene โดยส่วนใหญ่เกิดจาก gene deletion คือ มีการขาดหายไปของ base 3.7 หรือ 4.2 kilobase (kb) ซึ่งเป็นชนิดของ gene deletion ที่พบบ่อยใน α -thalassemia โดยในคนปกติจะมี α -globin gene อยู่ 4 gene ซึ่งอยู่บนสองข้างของ chromosome ข้างละ 2 gene ดังรูป



ดังนั้นความผิดปกติของ α -globin gene จึงแบ่งได้ดังนี้ คือ

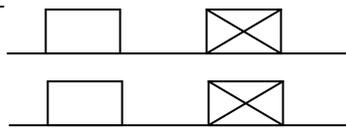
1) การขาดหายไปของ 1 gene ดังรูป



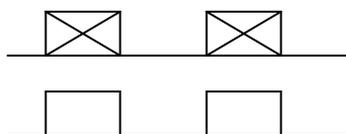
เรียกภาวะนี้ว่า α -thal 2 trait หรือ heterozygous α thal-2 โดยที่ข้างใดข้างหนึ่งของโครโมโซมจะปกติ แต่อีกข้างของโครโมโซมจะมีการขาดหายไปของ α -globin gene 1 ยีน

2) การขาดหายไปของ 2 gene แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

- การขาดหายไปของยีนที่อยู่คนละข้างของโครโมโซม ดังรูป เรียกภาวะนี้ว่า homozygous α thal-2

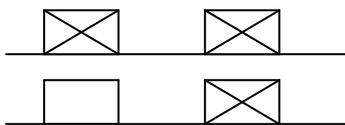


- การขาดหายไปของยีนที่อยู่บนข้างของโครโมโซมเดียวกัน ดังรูป เรียกภาวะนี้ว่า α thal-1 หรือ heterozygous α thal-1



ภาวะที่มีการขาดหายไปของ α -globin gene 1 หรือ 2 ยีนนั้น ยังเป็นภาวะที่ไม่ค่อยรุนแรงนัก คือยังไม่มีภาวะซีด และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปยังไม่พบความผิดปกติ ต้องอาศัยการตรวจยีนเท่านั้น จึงจะพบความผิดปกติได้ แต่ผู้ที่เป็น α -thal trait นั้นเป็นพาหะ (carrier) ว่าจะสามารถถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติไปสู่รุ่นลูกได้

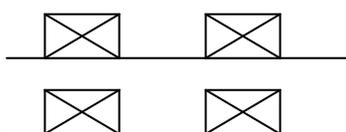
3) การขาดหายไปของ 3 gene ดังรูป



เรียกภาวะนี้ว่า α thal-1/ α thal-2 หรือ Hb H disease ซึ่ง Hb H อาจเกิดร่วมกับ Hb Cs ได้ ซึ่งจะเขียนสัญลักษณ์ได้เป็น α thal-1/Hb Cs

ผู้ที่ เป็น Hb H disease จะมีภาวะซีดเล็กน้อยที่ตรวจพบได้โดยดูจาก blood smear โดยพบลักษณะของ hypochromic microcytic RBC อาจมี poikilocytosis ได้บ้าง แต่ไม่มากนัก ความรุนแรงขึ้นอยู่กับว่ามี crisis เกิดขึ้นหรือไม่ ลักษณะของ blood smear อาจดูคล้ายภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก แต่ให้แยกกันตรงที่ polychromasia เนื่องจาก Hb H จัดเป็น hemolytic anemia ใน blood smear จึงพบ polychromasia ได้ แต่ใน iron deficiency anemia เป็นภาวะที่มีความผิดปกติของการสร้างเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจะไม่ค่อยพบ polychromasia

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆที่สามารถยืนยันการวินิจฉัยภาวะ Hb H ได้แก่ การทำ Hb electrophoresis ซึ่งพบ band A2, A, Bart's และ H ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการลดลงของสาย α -globin chain ทำให้มี γ และ β globin เหลือ จึงเกิดการจับกลุ่มกันเองของ γ และ β globin เกิดเป็น γ_4 (Hb Bart's) และ β_4 (Hb H) ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญอีกวิธีหนึ่ง คือ การตรวจหา inclusion bodies ซึ่งเป็นการทดสอบที่ทำโดยง่าย กล่าวคือ inclusion bodies เป็นการจับกลุ่มกันของ β globin หรือ β_4 (Hb H) นั่นเอง

4) การขาดหายไปของ α -globin gene ทั้ง 4 ยีน ดังรูป

เรียกภาวะนี้ว่า homozygous α thal-1 หรือ Hb Bart's hydrop fetalis เป็นภาวะที่รุนแรงที่สุด ซึ่งทำให้ทารกเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือหลังคลอดได้ไม่นานนัก เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ในเด็กแรกเกิดจะพบ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) มากที่สุด ดังนั้นถ้ามีการลดลงของการสร้าง α -globin chain อย่างมาก จะทำให้ γ globin chain จับกันเองเกิดเป็น γ_4 (Hb Bart's) ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับออกซิเจนอย่างแน่นหนา (high affinity) และไม่ยอมปล่อยออกซิเจนให้กับเนื้อเยื่อ ทำให้ทารกที่เป็น Hb Bart's hydrop fetalis เสียชีวิต เนื่องจากเนื้อเยื่อต่างๆขาดออกซิเจน

2.6.1.2. β thalassemia เป็นความผิดปกติของ β globin gene ซึ่งถ้าศึกษาในระดับอนุชีววิทยา จะพบว่ามีความแตกต่างของการเกิด mutation ได้มากกว่า 100 ชนิด ที่พบบ่อยในประเทศไทยมีมากกว่า 20 ชนิด ซึ่งความผิดปกติมีทั้ง gene deletion และ non gene deletion mutation ซึ่งอาจมีผลต่อ transcription, procession ของ mRNA หรือ translation ของ mRNA

β thalassemia แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

β^0 หมายถึง gene ไม่มีการสร้าง β globin chain

β^+ หมายถึง gene มีการสร้าง β globin chain ได้ แต่อยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ

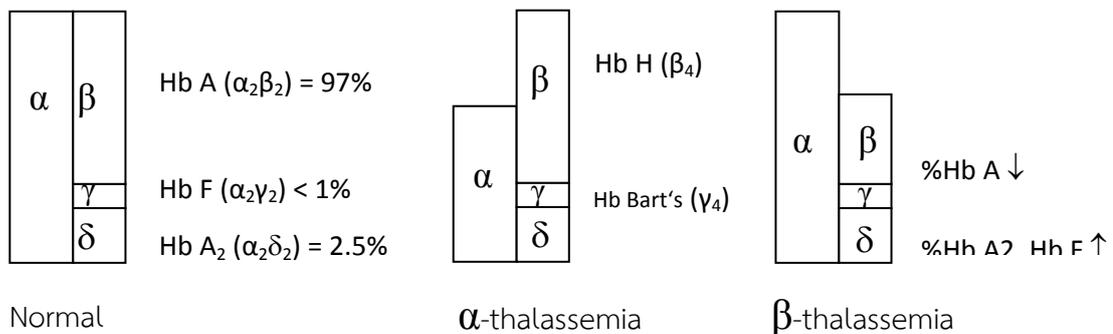
ผู้ที่เป็ β thalassemia แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

1) พาหะของ β thalassemia ซึ่งเรียกว่า β -thal trait ซึ่งอาจมีภาวะซีดเล็กน้อย แต่มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการตรวจพาหะ เนื่องจากสามารถถ่ายทอดยีนผิดปกติไปสู่รุ่นลูก และในกรณีทั้งพ่อและแม่เป็นพาหะทำให้บุตรมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคได้ถึง 1 ใน 4 (25%)

2) Homozygous β thalassemia จะมียีนที่ผิดปกติทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมจึงจัดว่าเป็นโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกันไป เนื่องจากความแตกต่างของ mutation ของ β globin chain ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ในผู้ที่เป็ β -thal trait หรือ Homozygous β thalassemia จะมีการสร้าง β globin chain ลดลง ทำให้เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนเป็น % ของ Hb ในผู้ใหญ่แล้วพบว่ามี % ของ HbA₂ และ Hb F สูง ในผู้ที่เป็ β -thal trait หรือ Homozygous β thalassemia (เนื่องจาก Hb A = $\alpha_2\beta_2$, Hb A₂ = $\alpha_2\delta_2$ และ Hb F = $\alpha_2\gamma_2$) โดยในผู้ที่เป็ β -thal trait จะมี Hb A₂ อยู่ระหว่าง 3.5-7.5% แต่ในผู้ที่เป็ Homozygous β thalassemia จะมี Hb A₂ >7.5%

บางครั้งอาจพบความผิดปกติของ β thalassemia ร่วมกับภาวะ hemoglobinopathies ที่พบบ่อย คือ β thalassemia ร่วมกับ Hb E เรียกว่า β /E โดยความรุนแรงอยู่ที่ระดับของ mutation เช่นกัน สมดุลของการสร้าง globin chain ในคนปกติ และในผู้ที่เป็ α และ β thalassemia สรุปดังรูปที่ 2.2

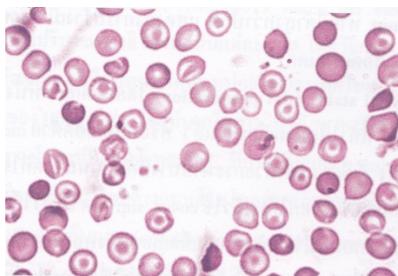


รูปที่ 2.2. แสดงสมดุลของการสร้าง globin chain ในคนปกติ และผู้ที่เป็ α และ β thalassemia

2.6.2. Hemoglobinopathies หมายถึง ภาวะที่มีความผิดปกติทางคุณภาพ (qualitative abnormalities) ของ globin chain ซึ่งชนิดของ hemoglobinopathies ที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่

2.6.2.1. Hb E เป็นความผิดปกติทางคุณภาพของ β globin chain เนื่องจากเกิด mutation ของยีน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ลำดับที่ 26 ของ β globin chain

เปลี่ยนจาก glutamic acid เป็น lysine มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น target cells (ดังรูปที่ 2.3.) โดย



รูปที่ 2.3. Target cells บน blood smear จาก homozygous Hb E (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

ถ้ามียีนข้างหนึ่งปกติแต่ยีนอีกข้างเป็น Hb E เรียกภาวะนี้ว่า Hb E trait ซึ่งถ้าทำ Hb electrophoresis จะพบ band E และ A ส่วนถ้ามียีนเป็น Hb E ทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมเรียกภาวะนี้ว่า homozygous Hb E ซึ่งถ้าทำ Hb electrophoresis จะพบ band E เพียงอย่างเดียว

บางครั้งอาจพบว่ายีนข้างหนึ่งเป็น hemoglobinopathies แต่มียีนอีกข้างหนึ่งเป็นธาลัสซีเมียได้ เช่น Hb E มักพบร่วมกับ β -thalassemia ซึ่งถ้าพบร่วมกันจะเรียกว่า β -thalassemia/Hb E (β /E) ซึ่งถ้าทำ Hb electrophoresis จะพบ band E และ F

2.6.2.2. Hb constant spring (Hb Cs) เป็นความผิดปกติทางคุณภาพของ α -globin chain เนื่องจากเกิด mutation ตรงลำดับของเบสที่ทำให้มีการหยุดสร้าง amino acid (stopping codon) ซึ่งเดิมมีรหัสเป็น UGA หรือ UAG เกิดมี mutation เปลี่ยนเป็น CAA ทำให้มีการสร้าง amino acid เพิ่มขึ้น 31 ลำดับ จากเดิมที่ α -globin chain มี amino acid 141 ลำดับ เป็น 172 amino acids เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า chain elongation

ในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่มี Hb Cs มักพบลักษณะของ basophilic stippling ซึ่งจะพบเป็นจุดขนาดเล็กละเอียดมีสีฟ้า (รูปที่ 2.4) และมีหลายจุดอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง Hb Cs อาจพบร่วมกับ α -thalassemia ได้



รูปที่ 2.4 ลักษณะของ basophilic stippling ซึ่งจะพบเป็นจุดขนาดเล็กละเอียดมีสีฟ้า (ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี, 2549)

2.7. การเกิดพยาธิสภาพและปัญหาทางคลินิกของธาลัสซีเมีย

ธาลัสซีเมีย เป็นกลุ่มโรคที่มีความรุนแรงต่างกัน อาจแบ่งธาลัสซีเมียตามความรุนแรงได้เป็น

2.7.1. *Thalassemia minor* พบในผู้ที่เป็นพาหะ (heterozygous; trait) ไม่พบอาการทางคลินิกที่เด่นชัด คือ ไม่มีภาวะโลหิตจาง ตับ และม้ามโต ตัวไม่เหลือง

2.7.2. *Thalassemia intermedia* ได้แก่ *thalassemia* ที่มีอาการรุนแรงปานกลางจะมีอาการซีด และมีการแตกของเม็ดเลือดแดงได้เป็นครั้งคราว เช่น Hb H พบว่ามีการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ในเวลาที่มีไข้ หรือติดเชื้อ ในบางรายของ β -*thalassemia*/Hb E ก็จะมีอาการแตกของเม็ดเลือดแดงปานกลาง

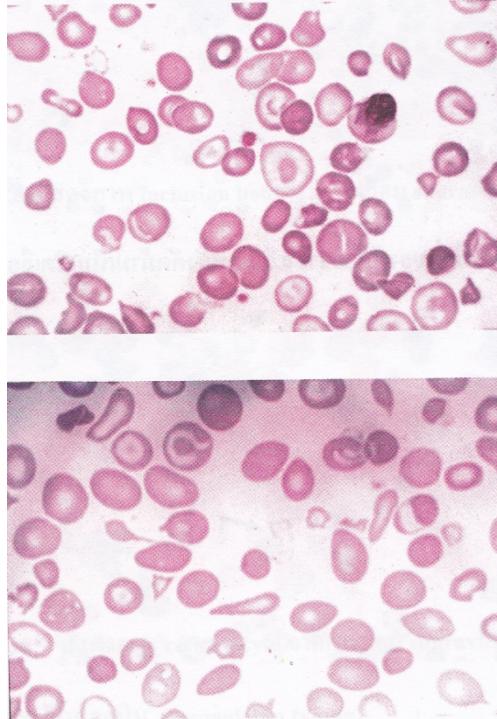
2.7.3. *Thalassemia major* เป็นธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงมาก พบในผู้ที่มียีนที่ผิดปกติตั้งแต่ 2 ชนิด เช่นในกรณีของ Homozygous β *thalassemia* หรือ β -*thalassemia*/Hb E จะเกิดพยาธิสภาพได้หลายอย่าง มีผลทำให้การสังเคราะห์สายโคสสายหนึ่งลดลง จึงมีการตกตะกอนของสายโกลบินที่เหลืออยู่ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความกระด้าง (rigid) deformability ของเม็ดเลือดแดงเสียไป เม็ดเลือดแดงส่วนหนึ่งจึงถูกจับทำลายตั้งแต่อยู่ในไขกระดูก (intramedullary cell death) ในขณะที่เม็ดเลือดแดงอีกส่วนหนึ่งถูกทำลายที่ม้าม (extravascular hemolysis) เป็นเหตุให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียเกิดภาวะม้ามโตได้ (splenomegaly) ดังรูปที่ 2.5



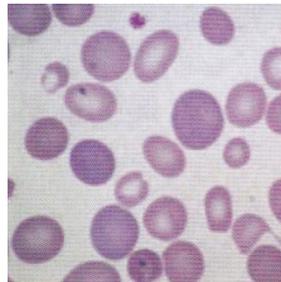
รูปที่ 2.5. แสดงภาวะม้ามโตในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

เม็ดเลือดแดงจึงมีอายุสั้นกว่าปกติและส่งผลให้เม็ดเลือดดงมีรูปร่างผิดปกติ (poikilocytosis) ด้วย โดยจะพบ (รูปที่ 2.6) spherocyte, ovalocyte และ schistocyte ได้ อาจพบการสร้างเม็ดเลือดแดงออกมาชดเชย จึงอาจพบ polychromasia (รูปที่ 2.7) ได้ จากภาวะที่มีการเร่งการสร้างเม็ด

เลือดแดงมาชดเชยอย่างมาก (massive erythropoiesis) ทำให้มีการขยายของกระดูกอย่างมาก โดยเฉพาะบริเวณไหวกักัม ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.6 ลักษณะ blood smear ของ thalassemia major (β /E) (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

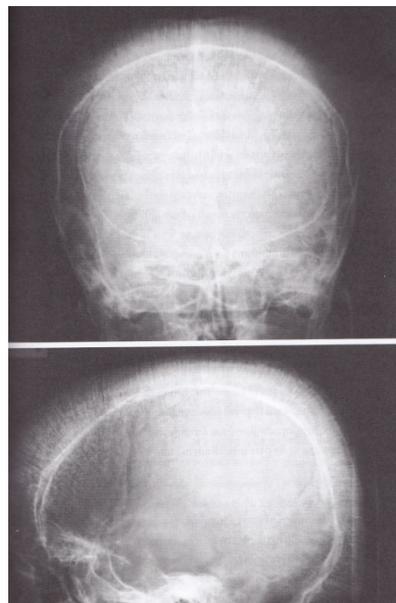


รูปที่ 2.7 ลักษณะของ polychromasia เป็นเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่ติดสีม่วง (ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี, 2549)



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะใบหน้าของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

จากภาพ X-ray ของกระดูกโหลกศีรษะของผู้ป่วย thalassemia major จะพบลักษณะที่เรียกว่า “hair on end appearance” เนื่องจากการขยายของกระดูกบริเวณกะโหลกศีรษะ ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงภาพ X-ray ของกระดูกโหลกศีรษะของผู้ป่วย thalassemia major ลักษณะที่เรียกว่า “hair on end appearance” (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

เนื่องจากผู้ที่เป็น thalassemia major จะมีการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงมาก จึงมีภาวะซีดมาก จำเป็นต้องรับเลือดอยู่บ่อยๆ จึงอาจทำให้เกิดปัญหาภาวะเหล็กเกินทำให้มีการสะสมของเหล็กในอวัยวะต่างๆได้ จำเป็นต้องให้ยาขับเหล็ก

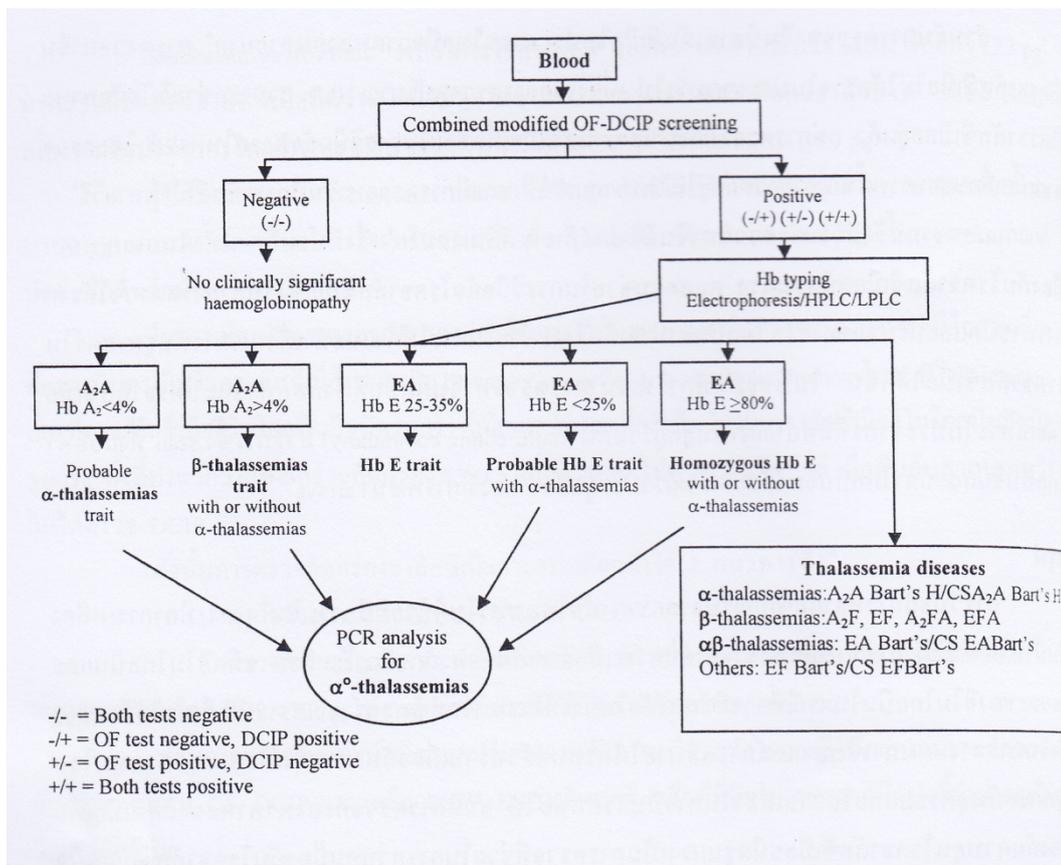
นอกจากนี้ยังมีธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงมากที่สุดโดยทำให้เกิดการเสียชีวิตตั้งแต่แรกคลอด คือ homozygous α thal-1 หรือ Hb Bart's hydrop fetalis ซึ่งเกิดจากการขาดหายไปของ α -globin gene ทั้งหมด ทำให้ γ globin chain จับกันเองเกิดเป็น γ_4 (Hb Bart's) ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับออกซิเจนอย่างแน่นหนา (high affinity) และไม่ยอมปล่อยออกซิเจนให้กับเนื้อเยื่อ ทำให้ทารกที่เป็น Hb Bart's hydrop fetalis เสียชีวิต เนื่องจากเนื้อเยื่อต่างๆขาดออกซิเจนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ทารกมีอาการบวม น้ำ และเสียชีวิตในครรภ์ได้ แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 อาการบวม น้ำ และเสียชีวิตของทารกที่มีภาวะ Hb Bart's hydrop fetalis (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

2.8. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

การวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียเริ่มจากการสงสัยในอาการในผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจาง มีอาการเหลือง ตับม้ามโต ตัวเล็ก การเจาะเลือดตรวจระดับความเข้มข้นของเลือด ลักษณะเม็ดเลือด ชนิดฮีโมโกลบิน และร้อยละของฮีโมโกลบิน ในกรณีที่มีข้อสงสัยในบางที่ที่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ DNA ได้ก็จะช่วยทั้งวางแผนการรักษา และการอธิบายให้ครอบครัวทราบเกี่ยวกับพยากรณ์โรค การควบคุมโรค ลักษณะพันธุกรรมและโอกาสเสี่ยงในการมีบุตรคนต่อไป ส่วนการตรวจกรองพาหะธาลัสซีเมียเพื่อป้องกันควบคุมโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเป็นการตรวจที่ช่วยในการควบคุมป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ จึงควรที่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ควรให้คำปรึกษาแก่คู่สมรส เพื่อตรวจกรองในเวลาที่เหมาะสม สำหรับวิธีการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและตรวจกรอง แสดงเป็นแผนผังเพื่อให้อธิบายให้เข้าใจได้ง่าย ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 แสดงแนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และ Hb E ที่เริ่มจากการตรวจคัดกรอง (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

2.8.1. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่

1) การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดที่ใช้หลอดทดลองหลอดเดียว

(one tube osmotic fragility test, OF)

เม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จะคงสภาพปกติ (biconcave) ไว้ได้ เนื่องจากน้ำในเซลล์เท่ากับน้ำภายนอกเซลล์ แต่ถ้าลดความเข้มข้นของน้ำเกลือจนถึงระดับหนึ่ง น้ำจะซึมเข้าเซลล์จนเม็ดเลือดแดงแตก เม็ดเลือดแดงจะแตกง่าย (increase osmotic fragility) หรือแตกยาก (decrease osmotic fragility) ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของพื้นที่ผนังเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่คือฮีโมโกลบิน ในภาวะที่เม็ดเลือดแดงมีอัตราส่วนดังกล่าวเพิ่มขึ้น (มีพื้นที่ผนังเซลล์มาก หรือมีฮีโมโกลบินน้อย) เม็ดเลือดแดงจะแตกยาก เช่น target cell (พบในพาหะธาลัสซีเมีย โรคธาลัสซีเมีย และโรคตับ) hypochromic cell (พบในธาลัสซีเมียและภาวะขาดธาตุเหล็ก) ส่วน spherocyte จะมีอัตราส่วนดังกล่าวลดลง (มีพื้นที่ผนังเซลล์ลดลง) เม็ดเลือดแดงจะแตกง่าย (ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541)

การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงทำได้โดยการดูการแตกของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือเข้มข้น 0.36% ในสารละลาย buffer pH 7.4 (Kattamis et al., 1981) ซึ่งโดยทั่วไปเม็ดเลือดแดงของคนปกติมากกว่า 95% ของเม็ดเลือดแดงในเลือดทั้งหมดจะแตกหมด ทำให้สารละลาย

ใส อ่านเป็นผลลบ (negative) แต่ถ้าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียและพาหะบางชนิดซึ่งเม็ดเลือดแดงขนาดเล็ก ปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์น้อย ร่วมกับมีความแตกต่างของขนาดเม็ดเลือดแดงมากจะแตกไม่หมด มีเม็ดเลือดแดงเหลืออยู่ ทำให้สารละลายขุ่นอ่านผลเป็นบวก (positive)

2) การตรวจคัดกรอง Hb E โดยการตกตะกอนด้วย dichlorophenol indophenols หรือ DCIP (DCIP precipitation test for Hb E screening)

โดยหลักการที่ว่า DCIP เป็นสารเคมีที่สามารถออกซิไดซ์ฮีโมโกลบินได้ทุกชนิด เมื่อนำไปอุ่นกับเลือดที่อุณหภูมิ 37 °C โดยที่ Hb E และฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรอื่นๆ เช่น Hb H ถูกออกซิไดซ์ให้ตกตะกอนเร็วกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่น จึงนำหลักการนี้มาใช้ในการตรวจกรอง Hb E และ Hb H (Fischer and Bowman, 1975; Kulapongs et al., 1976) โดยปริมาณตกตะกอนที่พบในผู้ป่วยที่เป็น homozygous Hb E จะมากกว่าผู้ที่ เป็นพาหะ Hb E และ Hb H อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้ ต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานประมาณ 1 ชั่วโมง และอ่านผลยาก เพราะน้ำยามีสีเข้ม ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ สุพรรณ ฟุ่เจริญ และคณะ จึงได้ทำการปรับปรุงสูตรการเตรียมน้ำยา DCIP และพัฒนาวิธีการตรวจขึ้นใหม่เป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูป ชื่อชุดน้ำยา KKU-DCIP-Clear (สุพรรณ ฟุ่เจริญ และคณะ สิทธิบัตรเลขที่ 18004) ซึ่งพบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก และค่าการทำนายผลลบสูง

3) การตรวจคัดกรองด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (RBC indices)

มีการใช้ MCV และ MCH เพื่อใช้ตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียอย่างแพร่หลายมานานแล้วในประเทศตะวันตก (Cao et al., 2002) และในปัจจุบันโรงพยาบาลจำนวนมากมีการใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงอัตโนมัติในการตรวจเลือด ซึ่งจะได้ค่า MCV และ MCH ออกมาด้วย ทำให้สะดวกต่อการทำงาน แต่การใช้ค่า MCV และ MCH มาใช้ตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมีย หรือโรคธาลัสซีเมีย ต้องทราบข้อจำกัดในการแปลผลและแยกออกจากภาวะอื่นๆที่มี MCV และ MCH ลดลง เช่น ภาวะขาดธาตุเหล็ก เป็นต้น

การใช้ค่า MCV น้อยกว่า 80 fl และหรือ MCH น้อยกว่า 27 pg มาตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย มีความไว และความจำเพาะต่ำกว่าการตรวจคัดกรองด้วย OF และ DCIP เนื่องจากประชากรไทยมีพาหะ Hb E จำนวนหนึ่งที่มีค่า MCV \geq 80 fl และ MCH \geq 27 pg (Sanchaisuriya et al., 2005)

2.8.2. การตรวจชนิดของฮีโมโกลบินด้วยเทคนิค chromatography

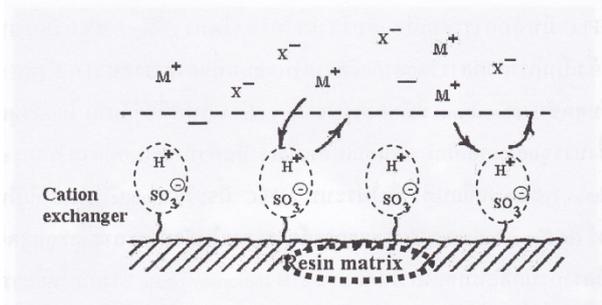
เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ ใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ low performance chromatography (LPLC) โดยอาศัยหลักการ cation exchange chromatography ในการแยกฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ทำให้ทราบทั้งชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่าง (ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541; กุลนภา ฟุ่เจริญ, 2549) เมื่อใส่เลือดที่เตรียมแล้วเข้าไปในเครื่อง เลือดและ buffer จะถูกอัดด้วยแรงดันสูงผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ จะปรากฏออกมาเป็นลักษณะโครมาโตแกรม (chromatogram) โดยเครื่องจะมีโปรแกรมวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟซึ่งกำหนดด้วยค่า retention time (RT) ระบุตำแหน่งของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ เช่น HbF, HbA, HbA2 และคำนวณออกมาเป็นปริมาณฮีโมโกลบินชนิดนั้นๆ ซึ่งวิธีการที่สำคัญคือต้องมีการควบคุมคุณภาพเป็นอย่างดี โดยการปรับตั้งเครื่องด้วยฮีโมโกลบินมาตรฐาน และฮีโมโกลบินควบคุม

ระบบ HPLC มีหลักการเช่นเดียวกับ liquid chromatography ธรรมดา คือเป็นการแยกสารโดยอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสารระหว่าง 2 phase โดย phase หนึ่งเป็นตัวดูดซับ (absorbent) ที่เรียกว่า stationary phase (phase ที่อยู่กับที่) โดยตัวดูดซับ ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนอีก phase หนึ่งเป็นตัวทำละลายที่ผ่านไปบน stationary phase เรียกว่า mobile phase (phase เคลื่อนที่) ซึ่งในระบบ HPLC นี้จะใช้สารละลาย buffer solution สารที่แยกจะต้องละลายในตัวทำละลายและถูกดูดซับบนตัวดูดซับได้ต่างกัน ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดใน stationary phase ต่างกัน โดยสารที่ละลายได้มากและถูกดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ทำให้แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีกว่า จะเคลื่อนที่ได้ช้าและแยกออกมาทีหลัง

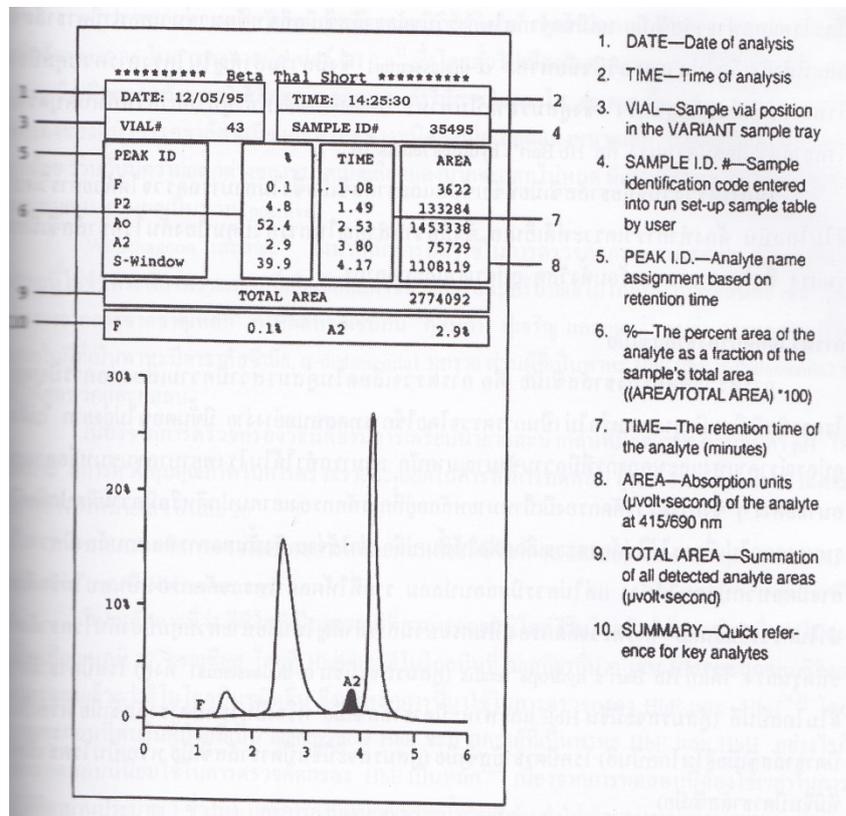
ระบบ HPLC มี pump แรงดันสูงอัด mobile phase ให้เคลื่อนที่เร็วขึ้น และใช้ stationary phase ที่มีขนาดเล็กบรรจุลงในคอลัมน์ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการแยกได้ดีขึ้น

สำหรับระบบ HPLC ใน เครื่องวิเคราะห์หัตถ์โนมิติ VARIANT 2 เป็นการแลกเปลี่ยนไอออน (ion) ชนิดไอออนบวก (cation exchange chromatography) ซึ่งเป็นการแยกโดยการเกิดแรงกระทำระหว่างไอออนในตัวอย่างเป็น mobile phase กับหมู่แลกเปลี่ยนไอออนบน stationary phase คือ silica gel ซึ่งเป็น resin ที่มีประจุบนผิวเป็นประจุลบ เพื่อแลกเปลี่ยนไอออนกับฮีโมโกลบินซึ่งมีประจุบวก ประจุบวกของฮีโมโกลบินจะจับที่ผิวของ silica gel เมื่อเติมสารละลาย buffer จะเป็นตัวทำให้ฮีโมโกลบินหลุดออกจากผิวของ silica gel และผ่านออกจากคอลัมน์ (รูปที่ 3.1) แต่เนื่องจากเลือดมีฮีโมโกลบินปนกันหลายชนิด ซึ่งมีความแรงของประจุไม่เท่ากัน จึงต้องมีการเปลี่ยนแปลงความแรงของประจุของ mobile phase ในขณะที่แยกสาร โดยเปลี่ยนแปลงสัดส่วนในการผสมกันของสารละลาย buffer 2 ชนิด คือสารละลาย A และ B ที่มีความแรงของประจุต่างกัน เพื่อให้ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ที่ระยะเวลาต่างกัน หรือ retention time ที่เป็นคุณสมบัติจำเพาะต่อฮีโมโกลบินแต่ละชนิด (รูปที่ 3.2) สามารถระบุชนิดฮีโมโกลบินได้ ส่วนการวัดปริมาณของฮีโมโกลบินทำโดยการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดโดย photometer วัดที่ความยาวคลื่น 450 nm และคำนวณหาปริมาณฮีโมโกลบินออกมาเป็นร้อยละ ซึ่งคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์หัตถ์โนมิติ สามารถวินิจฉัยพยาธิภาวะ β -thalassemia (Hb A₂ > 3.5%) โรค β -thalassemia พาหะ Hb E, homozygous Hb E และโรค α -thalassemia อย่างที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การวิเคราะห์มีข้อจำกัดในการวินิจฉัยพยาธิภาวะ α -thalassemia โดยเฉพาะพาหะ α -thalassemia-1 ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง คือ Hb Bart 's hydrop fetalis



รูปที่ 2.12 การแลกเปลี่ยนประจุของ resin กับ ion ในสารละลาย buffer ในภาวะสมดุล (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)



รูปที่ 2.13 แสดงตัวอย่างการรายงานชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆจาก HPLC (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552)

2.8.3. การวิเคราะห์ DNA

การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยทำให้มีการเพิ่มจำนวนของโมเลกุล DNA ผ่านปฏิกิริยาในหลอดทดลอง (*In vitro*) ทำให้ชิ้นส่วนของปริมาณ DNA ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (Cooper and Hausman, 2004)

ปัจจุบันเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ DNA โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิค PCR ได้ถูกพัฒนาขึ้นจนใช้วินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียได้อย่างกว้างขวาง (ปราณี พุเจริญ และสุทัศน์ พุเจริญ, 2541) ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิค และสามารถตรวจยีนทั้ง α และ β ไว้อย่างครบถ้วน (กุลนภา พุเจริญ, 2549)

การตรวจ α - thalassemia 1 gene ในประชากรไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าความผิดปกติส่วนใหญ่เป็นชนิด Southeast Asian (SEA deletion) ที่พบได้บ่อย และชนิด THAI deletion ที่พบได้ไม่บ่อยนัก ในภูมิภาคอื่นของประเทศไทย (อรุณี เจตศรีสุภาพ, 2552) ได้มีการพัฒนาการตรวจ α - thalassemia 1 gene หลายวิธี สำหรับการตรวจ α - thalassemia 2 gene, Hb Cs และ Hb Paksé นั้นตรวจโดยวิธี PCR เช่นกัน (กุลนภา พุเจริญ, 2549) ถึงแม้ว่ายีนดังกล่าวไม่ทำให้เกิดธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง แต่การตรวจช่วยในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียที่มี genotype ที่ซับซ้อน (Jetsrisuparb et al., 2006)

สำหรับการตรวจหายีน β - thalassemia ในประชากรไทยมีความหลากหลายมาก การตรวจหายีน β - thalassemia ไม่ได้ตรวจในประชากรทั่วไป เนื่องจากการตรวจดูปริมาณ HbA2 สามารถช่วยวินิจฉัยพาหะ β - thalassemia อยู่แล้ว แต่การตรวจหายีน β - thalassemia เพื่อช่วยวินิจฉัยทารกในครรภ์ โดยตรวจจากเนื้อเยื่อของทารกตั้งแต่อายุครรภ์อยู่ในไตรมาสแรก โดยมีการตรวจหายีน β - thalassemia หลายวิธี (กุลนภา พุเจริญ, 2549)

นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจหายีนผิดปกติอีกมากมาย ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในการควบคุมป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง และช่วยวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่ไม่สามารถตรวจได้จากการตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินได้ตามปกติ ซึ่งช่วยในการให้คำแนะนำการปรึกษาทางพันธุศาสตร์ของโรคธาลัสซีเมียได้ดีขึ้น

2.9. สถานการณ์ของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับควบคุม α -thalassemia

ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ที่ทำให้มีการสร้างฮีโมโกลบินที่ผิดปกติเป็นผลให้ร่างกายสร้างสายโกลบินโปรตีนได้ลดลงหรือไม่มีการสร้างเลย เม็ดเลือดแดงจะมีลักษณะผิดปกติและแตกง่าย ประเทศไทยมีธาลัสซีเมียที่ผิดปกติหลายชนิด การพบร่วมกันของยีนที่หลากหลายนี้ ทำให้เกิดความผิดปกติและมีพยาธิสภาพความรุนแรงแตกต่างกัน เริ่มจากไม่แสดงอาการ จนถึงอาการรุนแรงมากที่สุดคือ เสียชีวิตตั้งแต่ในครรภ์หรือแรกคลอด (Wasi, 1981; Fucharoen and Winichagoon, 1992) ประมาณการว่าประเทศไทยมีผู้ที่มีกรรมพันธุ์หรือยีนธาลัสซีเมียมากกว่า 24 ล้านคน และมีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงประมาณร้อยละ 1 ของประชากรหรือประมาณ 630,000 คน โดยจะมีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นปีละ 4,253 ราย มีค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของผู้ป่วยรายใหม่ที่เพิ่มขึ้นนี้ปีละ 21,487 ล้านบาท (สำนักส่งเสริมสุขภาพ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2550) โรคธาลัสซีเมียจึงเป็นภาระหนักทั้งการแพทย์ สังคม และเศรษฐกิจของประเทศ กระทรวงสาธารณสุขจึงได้ประกาศนโยบาย ส่งเสริม ป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติของประเทศไทยขึ้นมา (วิชัย เทียนถาวร, 2548) ให้เป็นสิทธิขั้นพื้นฐานของหญิงตั้งครรภ์และสามีที่จะต้องได้รับบริการตรวจคัดกรองและตรวจยืนยันว่าเป็นคู่สมรสเสี่ยงที่มีโอกาสมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียรุนแรงหรือไม่ ถ้าเสี่ยง

ก็จะได้รับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์มารดา ก่อนคลอดทุกราย โดยสถานบริการทุกแห่งจะต้องจัดระบบการให้บริการให้ได้มาตรฐาน

นับตั้งแต่เริ่มมีการดำเนินงานในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย นอกจากจำนวนการส่งตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในงานประจำวันจะเพิ่มขึ้นอย่างมากแล้ว ความต้องการในการตรวจหาความผิดปกติของโรคในระดับโมเลกุลก็เพิ่มขึ้นอย่างมากด้วย ทั้งนี้เนื่องจากผลการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล ให้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคได้ชัดเจน และใช้เป็นหลักในการทำนายความรุนแรงของโรคได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยให้การวินิจฉัยที่ถูกต้องในกรณีที่ผลการตรวจเลือดและการตรวจฮีโมโกลบินในงานประจำวันมีความซับซ้อน ไม่สามารถให้การวินิจฉัยที่ชัดเจนได้ อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล มีวิธีการที่ยุ่งยาก ราคาแพง และมีวิธีการตรวจหลากหลาย การเลือกแนวทางและวิธีการตรวจที่ถูกต้องและเหมาะสม จะช่วยให้การตรวจมีประสิทธิภาพมากขึ้น (สุพรรณ พุ้เจริญ, 2554)

ปัญหาในระดับชุมชน คือการตรวจหาผู้ที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทยนั้น ต้องเป็นเทคนิคที่ง่าย ราคาถูก ไม่ใช่เครื่องมือซับซ้อน ที่สำคัญคือสามารถนำไปปฏิบัติได้ที่ระดับสถานีอนามัย ที่มีข้อจำกัด ทั้งบุคลากร ประสิทธิภาพ และเครื่องมือ ดังนั้นจุดประสงค์ของการตรวจคัดกรองอย่างง่ายนี้ เป็นการตรวจเพื่อคัดออก (screen out) ผู้ที่ให้ผลการตรวจเป็นลบ (negative) ไม่จำเป็นที่จะต้องทำการตรวจต่อไปด้วยวิธีการอื่น เพราะถ้าเป็นพาหะ เช่น α -thalassemia จะเป็นชนิดที่เมื่อแต่งงานกับผู้มีธาลัสซีเมียชนิดอื่น ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียแบบที่มีอาการปานกลาง ผลการตรวจคัดกรองที่เป็นบวก (positive) ไม่ได้แสดงว่าผู้้นั้นต้องเป็นพาหะแน่นอน จะต้องทำการตรวจตัวอย่างเลือดนั้นต่อไปด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อให้ได้การวินิจฉัยชนิดของพาหะที่ถูกต้อง การตรวจคัดกรองแบบง่ายนี้อาจสูงที่จะได้ผลการตรวจเป็น false positive โดยเฉพาะจากภาวะขาดธาตุเหล็ก (iron deficiency anemia) ซึ่งจะให้ผลการตรวจ osmotic fragility test เป็นบวก เช่นเดียวกับผู้ที่เป็น α -thalassemia 1 trait และ β -thalassemia trait เป็นต้น

ปัจจุบันเทคนิคที่ง่ายที่สุดและสะดวกที่สุดในการตรวจหาผู้ที่เป็นพาหะโรคธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา ดังกล่าวนี้คือ เทคนิค one tube osmotic fragility test (OFT) (ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541; บุญเชียร ปานเสถียรกุล, 2546; บุญเชียร ปานเสถียรกุล, 2546; สำนักส่งเสริมสุขภาพ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2544) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถนำไปตรวจหาพาหะธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาในพื้นที่ห่างไกลหรือนอกห้องปฏิบัติการได้ อย่างไรก็ตามยังมีอัตราการผลิตผลลบจาก one tube osmotic fragility test ในการตรวจคัดกรองพาหะของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาได้ผลลบที่ได้จาก โดยเฉพาะ heterozygous beta thalassaemia, heterozygous alpha thalassaemia-1 และ homozygous Hb E ไม่ควรเกิดขึ้นในทางทฤษฎี แต่ในทางปฏิบัติความผิดพลาดดังกล่าวเกิดขึ้นได้จากสาเหตุต่าง ๆ โดยอาจเกิดจากผู้ตรวจวิเคราะห์และลงผล (เอกอมร เทพพรหม และคณะ, 2553; ธนุศักดิ์ ตาตุ, 2551) นอกจากนี้ วิธีการตรวจพาหะธาลัสซีเมียที่ให้ผลถูกต้องคือวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) นั้น มีข้อจำกัด คือ ขั้นตอนซับซ้อน ต้องใช้ร่วมกับเครื่องมือหลายชนิด และมีต้นทุนสูง จึงเหมาะสำหรับตรวจตัวอย่างในห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนไม่มาก และไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจในประชากรจำนวนมาก immunochromatographic strip test เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และต้นทุนต่ำ เช่นเดียวกับ one

tube osmotic fragility test แต่มีความไว (100%) ความแม่นยำ (98%) สูง และมีขั้นตอนการทำที่ง่ายใช้เวลาตรวจเพียง 3 นาที ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือใดๆ และไม่ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการตรวจวิเคราะห์ สามารถตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ตได้อย่างจำเพาะ โดยไม่ทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลบินชนิดอื่น (Wanapirak et al., 2011)

นอกจากนี้ทางภาครัฐและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องมีการจัดสัมมนา เพื่อสนับสนุนบริษัทธุรกิจขนาดย่อม (SMEs) ที่ทำธุรกิจเกี่ยวกับวัสดุทางการแพทย์และเครื่องมือด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ ในการพัฒนาอุตสาหกรรมวัสดุทางการแพทย์ และเครื่องมือด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2554) ซึ่งบริษัท มิตรเมตติคอล จำกัด ได้เข้าร่วมการสัมมนาครั้งนี้ด้วย ทางบริษัทจึงเล็งเห็นประโยชน์ในการร่วมทำวิจัยครั้งนี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับสนับสนุนคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายอยู่

จากสถิติการตรวจพบพาหะธาลัสซีเมียในหญิงตั้งครรภ์ และคู่สามี ที่ตรวจจากห้องปฏิบัติการงานชั้นสูงตรสารณสุข โรงพยาบาลกุดจับ จังหวัดอุดรธานี ซึ่งเป็นโรงพยาบาลระดับชุมชนขนาด 30 เตียงในปี พ.ศ. 2553 พบว่าการคัดกรองธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาโดยวิธี one tube osmotic fragility test (OFT) ให้ผลบวก 83 ราย จาก ตัวอย่างทั้งหมด 427 ราย และเมื่อนำมาตรวจยืนยันโดยวิธีมาตรฐานแล้ว เป็นพาหะธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาเพียง 24 ราย เท่านั้น (โรงพยาบาลกุดจับ จังหวัดอุดรธานี, 2553) ซึ่งหากนำวิธี immunochromatographic strip test มาใช้ในการตรวจคัดกรองด้วย อาจจะทำให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือมากขึ้น โดยลดการเกิดผลลบลงจากวิธี one tube osmotic fragility test (OFT) นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนผลบวกหลงจาก ภาวะขาดธาตุเหล็ก (iron deficiency anemia) ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมจากการตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานได้

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพ และความแม่นยำของวิธี immunochromatographic strip test (GPO α THAL IC strip test) กับวิธี one tube osmotic fragility test (OFT) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กับงานชุมชนในปัจจุบัน โดยเก็บตัวอย่างจากหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรส และยืนยันด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และวิธี PCR เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการเลือกใช้วิธีตรวจคัดกรองโรคในระดับชุมชนต่อไป