

ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และความสัมพันธ์ทางคลินิกที่มีต่อผู้ป่วยโรค
มาลาเรียในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้



นางสาวสุภลักษณ์ พารา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

PREVALENCE OF ALPHA-THALASSEMIA, HBE AND THEIR CLINICAL CORRELATION IN
MALARIA PATIENTS IN SOUTHEAST ASIA



Miss Suparak Para

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และ
ความสัมพันธ์ทางคลินิกที่มีต่อผู้ป่วยโรคมาลาเรียในเอเชีย
ตะวันออกเฉียงใต้

โดย

นางสาวสุภลักษณ์ พารา

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฐฐ์ ประพันธ์วัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อิศรางค์ นุชประยูร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศรีวิชา ครุฑสูตร)

สุภลักษณ์ พารา : ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และความสัมพันธ์ทางคลินิกที่มีต่อผู้ป่วยโรคมาลาเรียในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. (PREVALENCE OF ALPHA-THALASSEMIA, HBE AND THEIR CLINICAL CORRELATION IN MALARIA PATIENTS IN SOUTHEAST ASIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ชาลีสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร, 82 หน้า.

ธาลัสซีเมียและ hemoglobinopathies เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรม ส่งผลให้ผู้ป่วยมีภาวะโลหิตจาง แอลฟาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอีถูกเสนอว่ามีคุณสมบัติต้านโรคมาลาเรีย แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของแอลฟาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอี ต่อการต้านมาลาเรียที่รุนแรงยังไม่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงศึกษาความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี และความสัมพันธ์ต่อมาลาเรียที่รุนแรงในผู้ป่วยชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จำนวน 199 คน ที่ติดเชื้อฟัลซิพารัมหรือไวแวกซ์ โดยพบความถี่ของอัลลีล $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, --SEA, α^{CS} และ β^E เท่ากับ 0.274, 0.008, 0.005, 0.010 และ 0.113 ตามลำดับ และไม่พบ --FIL ผลการศึกษาพบว่าการติดเชื้อฟัลซิพารัมมีความเสี่ยงต่อมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่าเชื้อไวแวกซ์ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงและธาลัสซีเมียพบว่า $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$ หรือ β^E/β^E มีแนวโน้มต่อการต้านมาลาเรียขั้นรุนแรง ขณะที่ β^E/β^A ร่วมกับ $\alpha^{3.7}/\alpha^A$ มีความเสี่ยงต่อภาวะมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่ากลุ่ม α^A/α^A / β^A/β^A (RR=6.000, 95% CI=1.693-21.262; $p = 0.014$) การศึกษาแสดงให้เห็นว่า $\alpha^{3.7}$ และ β^E ต่างก็มีบทบาทต่อการต้านมาลาเรียที่รุนแรง แต่เมื่อการกลายพันธุ์ทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันย่อมส่งผลกระทบต่อทางขัดแย้ง ผลการศึกษาสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังและรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่รุนแรงได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

5474187730 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: α -THALASSEMIA / HEMOGLOBIN E / MALARIA / SOUTHEAST ASIA

SUPARAK PARA: PREVALENCE OF ALPHA-THALASSEMIA, HBE AND THEIR CLINICAL CORRELATION IN MALARIA PATIENTS IN SOUTHEAST ASIA.
ADVISOR: CHALISA LOUICHAROEN CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 82 pp.

Thalassemia and hemoglobinopathies are genetic disorders that cause anemia. It has been proposed that alpha-thalassemia and hemoglobin E provide protective effect against severe malaria. However, protective mechanism of alpha-thalassemia and hemoglobin E against severe malaria remains unclear. Therefore, we investigated allele-genotype frequency of alpha-thalassemia and hemoglobin E and its correlation with severe malaria in 199 Plasmodium falciparum (Pf.) or Plasmodium vivax (Pv.) infected Southeast Asian patients. Allele frequency of $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, --SEA, α^{CS} , and β^E were 0.274, 0.008, 0.005, 0.010, and 0.113 respectively and --FIL was not found. The number of severe malaria in Pf. was significantly ($p < 0.05$) higher than Pv. We found that homozygote α^{CS} and β^E protected against severe malaria. Based on our analysis, we found that genotype - $\alpha^{3.7}/\alpha$, β^E/β^A increased risk of severe malaria (RR = 6.000, 95% CI = 1.693-21.262; p-value = 0.014). This study shows that expression either - $\alpha^{3.7}$ or β^E provide protective effect against severe malaria. However, simultaneous expression of both - $\alpha^{3.7}$ and β^E increases risk of severe malaria. Results from this study could be useful in monitoring and treatment patients with severe malaria.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อ. ดร.ชาลิสาลหุยเจริญ ชีพสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดต่างๆตลอดจนการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จสมบูรณ์ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.พิสิฐ ทรัพย์วิวัฒน์ (ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์) ศ. ดร. นพ.อิศรางค์ นุชประยูร และ ศ. พญ.ศรีวิชา ครุฑสูตร (กรรมการสอบวิทยานิพนธ์) ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย รวมทั้ง กรุณาให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และได้กรุณาช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคุณอาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดระยะเวลาการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่หน่วยวิจัยมาลาเรียคลินิก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัยมาลาเรีย คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดลที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการให้ข้อมูล และกรุณาเก็บตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ น.ส. นนทพร อังศุวิทยา น.ส. หทัยชนก เบญจรงค์รัตน์ และสมาชิกห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ 828 ตึกแพทยพัฒน์ สำหรับมิตรภาพอันดี และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา และญาติผู้ใหญ่ เป็นอย่างสูง สำหรับกำลังใจ และการสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของงานวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐาน.....	3
1.5 คำสำคัญ.....	3
1.6 รูปแบบการวิจัย.....	3
1.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	3
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ฮีโมโกลบิน.....	5
2.2 ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ.....	6
2.3 ความชุกของโรคธาลัสซีเมียและ hemoglobinopathies ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้.....	7
2.4 อณูพันธุศาสตร์ของยีนแอลฟาโกลบิน และ ยีนเบต้าโกลบิน.....	7
2.5 การกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินและเบต้าโกลบิน.....	9
2.5.1 การกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน.....	9
2.5.2 การกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินชนิดของเบต้าธาลัสซีเมียและ heamoglobinopathies.....	11
2.6 อาการของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และ hemoglobinopathies.....	13
2.7 การตรวจโรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia screening) และ hemoglobinopathies.....	14

2.7.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) heterozygous ธาลัสซีเมีย	14
2.7.2 การตรวจยืนยันโดยวิธีมาตรฐาน	16
2.8 มาลาเรีย (Malaria)	17
2.9 วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม	17
2.10 ลักษณะอาการของผู้ป่วยมาลาเรีย	19
2.11 การตรวจวินิจฉัยมาลาเรีย	22
2.12 มาลาเรียและธาลัสซีเมีย	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 ประชากรที่ใช้ในการวิจัย	25
3.1.1 ประชากรและตัวอย่าง	25
3.1.2 ขนาดตัวอย่าง	25
3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดและการเก็บข้อมูลผู้ป่วย	26
3.3 การตรวจทางโลหิตวิทยา	27
3.4 การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เชิงปริมาณวิเคราะห์	27
3.5 การสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม	28
3.6 การคัดกรองผู้ป่วยธาลัสซีเมีย	29
3.7 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาและเบต้าโกลบิน	29
3.7.1 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินด้วยเทคนิค Multiplex Gap-polymerase chain reaction (Multiplex Gap-PCR)	29
3.7.2 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง	32
3.7.3 การตรวจการกลายพันธุ์ชนิด HbE codon 26 (G → A)	33
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	35
3.8.1 วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย	35
3.8.2 วิเคราะห์ข้อมูลการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมาลาเรีย	35
3.8.3 คำนวณความชุกของโรคธาลัสซีเมียแต่ละชนิดในผู้ป่วยมาลาเรีย	36
3.8.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียกับอาการต่างๆ ทางคลินิกของมาลาเรีย	36
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	37
4.1 กลุ่มประชากรที่ศึกษา	37

4.2 การคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	37
4.3 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาและเบต้าโกลบิน	38
4.3.1 การกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน	38
4.3.2 การกลายพันธุ์ชนิดHbE codon 26 (G → A)	40
4.4 ผลการคัดกรองผู้ป่วยธาลัสซีเมีย.....	40
4.5 ข้อมูลของกลุ่มประชากรที่ศึกษา.....	42
4.6 การวิเคราะห์ความถูกต้องของข้อมูลจีโนไทป์ตามทฤษฎีฮาร์ดี – ไวเบอร์ก	43
4.7 ความชุกของธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรีย.....	44
4.7.1 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามเชื้อชาติของผู้ป่วยมาลาเรีย	45
4.7.2 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับ	48
4.7.3 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามความรุนแรงของมาลาเรีย.....	51
4.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกจากการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ที่พบการกลาย พันธุ์แบบแอลฟาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และกลุ่ม control.....	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	64
5.1 ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคมมาลาเรีย	66
5.2 ชนิดของเชื้อมาลาเรียที่รับกับมาลาเรียขั้นรุนแรง และชนิดการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมีย .	66
5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี ต่ออาการทางคลินิกของโรค มาลาเรีย	67
รายการอ้างอิง	70
ภาคผนวก ก.....	75
ภาคผนวก ข.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	82

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย MCV (mean corpuscular volume) ตามช่วงอายุ	15
ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	27
ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ของยีนแอลฟาโกลบิน	30
ตารางที่ 4 ผลการคัดกรองธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรียโดยใช้ค่า MCV.....	41
ตารางที่ 5 ข้อมูลของผู้ป่วยมาลาเรีย	42
ตารางที่ 7 ผู้ป่วยมาลาเรียแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย	44
ตารางที่ 8 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามเชื้อชาติของผู้ป่วยมาลาเรีย.....	46
ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียกับการติดเชื้อมาลาเรีย.....	49
ตารางที่ 10 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับพยาธิสภาพของมาลาเรีย ขั้นรุนแรง	51
ตารางที่ 11 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับพยาธิสภาพของมาลาเรีย ขั้นปานกลาง.....	52
ตารางที่ 12 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง	53
ตารางที่ 13 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นปานกลาง	53
ตารางที่ 14 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง	54
ตารางที่ 15 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นปานกลาง	54
ตารางที่ 16 ลักษณะของมาลาเรียขั้นรุนแรงแยกตามจีไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี	56
ตารางที่ 17 ลักษณะของมาลาเรียขั้นรุนแรงในผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แอลฟาธาลัสซีเมียและ ฮีโมโกลบินอีร่วมกัน.....	57
ตารางที่ 18 ลักษณะของมาลาเรียระดับปานกลางแยกตามจีไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียและ ฮีโมโกลบินอี	58
ตารางที่ 19 ลักษณะของมาลาเรียระดับปานกลางในผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แอลฟาธาลัสซีเมียและ ฮีโมโกลบินอีร่วมกัน.....	59

ตารางที่ 20 ลักษณะของมาลาเรียแบบ Hyperbilirubinemia แยกตามจีไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี 60

ตารางที่ 21 ลักษณะของมาลาเรียแบบ Hyperbilirubinemia ในผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกัน..... 61

ตารางที่ 22 ลักษณะของมาลาเรียขั้นรุนแรงในผู้ป่วยแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย..... 62

ตารางที่ 23 ลักษณะของมาลาเรียระดับปานกลางในผู้ป่วยแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย..... 63



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน	5
ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีนโกลบินชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงของพัฒนาการ	6
ภาพที่ 3 การจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบิน	8
ภาพที่ 4 การจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่มเบต้าโกลบิน	8
ภาพที่ 5 โกลบินทั้ง 4 สายที่สร้างจากยีนแอลฟาโกลบินและยีนเบต้าโกลบิน.....	8
ภาพที่ 6 ตำแหน่งของยีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไปของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย	10
ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งของยีนที่สร้างฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb CS).....	10
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของยีนแอลฟาโกลบิน	11
ภาพที่ 9 แสดงฮีโมโกลบินที่ปกติ (HbF, HbA, HbA ₂) และ ฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ (HbH, Hb Bart's)	13
ภาพที่ 10 การกระจายตัวของโรคมาลาเรียในปี ค.ศ. 2010	17
ภาพที่ 11 วงจรชีวิตของเชื้อปรสิตพลาสโมเดียม	19
ภาพที่ 12 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน	30
ภาพที่ 13 ตัวอย่างผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน และขนาด PCR product.	31
ภาพที่ 14 ตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด HbCS.....	32
ภาพที่ 15 ตัวอย่างผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด Hb CS และขนาด PCR product	33
ภาพที่ 16 ตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด HbE	34
ภาพที่ 17 แสดงตำแหน่งและผลที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ <i>MnII</i>	35
ภาพที่ 18 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในผู้ป่วยมาลาเรียที่ศึกษา	37
ภาพที่ 19 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน	38
ภาพที่ 20 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (HbCS)	39
ภาพที่ 21 ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์แบบต่างๆ ในผู้ป่วยมาลาเรียที่พบการกลายพันธุ์	39
ภาพที่ 22 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินอี (HbE).....	40
ภาพที่ 23 ข้อมูลของผู้ป่วยมาลาเรียแยกตามเชื้อชาติ.....	43
ภาพที่ 24 ลักษณะของธาลัสซีเมียในแต่ละกลุ่มเชื้อชาติ	45
ภาพที่ 25 ความชุกของธาลัสซีเมียในแต่ละเชื้อชาติ.....	47

ภาพที่ 26 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมีย	48
ภาพที่ 27 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเชื้อ ชาติพม่า.....	49
ภาพที่ 28 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเชื้อ ชาติไทย.....	50
ภาพที่ 29 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ มาจากจังหวัดตาก	50
ภาพที่ 30 ชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย.....	51

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ธาลัสซีเมีย (Thalassemia) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบยีนด้อย (autosomal recessive) ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนสร้างโปรตีนโกลบิน (globin) ทำให้ยีนสังเคราะห์โกลบินได้น้อยลงหรือไม่สามารถสังเคราะห์ได้ (1) เป็นเหตุให้ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และเม็ดเลือดแดงมีลักษณะผิดปกติ ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการซีด อ่อนเพลีย และมีภาวะโลหิตจางอันเนื่องมาจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) ดังนั้นผู้ป่วยจึงต้องได้รับเลือดเป็นประจำ ทำให้เสี่ยงต่อภาวะธาตุเหล็กเกิน ซึ่งมีผลทำลายอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ และหัวใจ ทำให้เกิดภาวะตับแข็ง หัวใจล้มเหลว และมักเสียชีวิตก่อนวัยอันควร (2) ธาลัสซีเมียมีความชุกสูงในหลายประเทศทั่วโลก เช่น แอฟริกา เมดิเตอร์เรเนียน และแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบพาหะของธาลัสซีเมียถึงร้อยละ 35-40 ในภูมิภาคนี้ (3) นอกจากนี้ยังพบภาวะ hemoglobinopathies ที่ฮีโมโกลบินผิดปกติจนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เช่น ฮีโมโกลบินอี (HbE) มากถึงร้อยละ 50-60 โดยพบมากบริเวณจุดเชื่อมต่อของประเทศ ไทย ลาว และกัมพูชา ฮีโมโกลบินอีจึงถือเป็นความผิดปกติที่จำเพาะของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (4)

ในปี ค.ศ.1949 Haldane ได้ตั้งสมมติฐานว่าผู้ที่มีภาวะแฝงความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดงอาจป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้ เพราะพบผู้ป่วยธาลัสซีเมียและ hemoglobinopathies จำนวนมากในบริเวณที่มalariaเรียกชุกชุม (5) ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาบทบาทของการกลายพันธุ์ของยีนที่ก่อโรคธาลัสซีเมียต่อการป้องกันและลดความรุนแรงของการติดเชื้อมาลาเรีย โดยจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าการกลายพันธุ์ของยีนโกลบินที่ก่อโรคธาลัสซีเมียได้รับการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) เพื่อต้านโรคมาลาเรีย (6) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่สนับสนุนข้อสันนิษฐานดังกล่าว เช่นจากผลการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าเม็ดเลือดแดงชนิด α -thalassemia ทั้งแบบ heterozygous ($-\alpha/\alpha\alpha$), heterozygous ($--/\alpha$) และ homozygous ($-\alpha/-\alpha$) ที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (*P. falciparum*) จะไม่สามารถยึดเกาะกับ microvascular endothelial cells (MVECs) ได้ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของมาลาเรียชนิดรุนแรง (severe malaria) (7) อีกทั้งในการศึกษาทางระบาดวิทยาของ Chotivanich และคณะ ที่พบว่าความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด heterozygous HbE สามารถลดการบุกรุก (invasion) ของเชื้อฟัลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้เมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ (8) แต่กลับไม่พบผลกระทบดังกล่าวใน homozygous HbE นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า homozygous HbE สามารถลดการเจริญเติบโต

ของเชื้อพลาสมาได้ (9) ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าทั้ง homozygous และ heterozygous HbE มีกลไกในการต้านเชื้อพลาสมาที่ต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาที่แสดงผลขัดแย้งต่อการวิจัยข้างต้น อาทิเช่น Naka และคณะ พบว่า HbE ไม่สามารถต้านมาลาเรียพลาสมาชนิดรุนแรงได้ เนื่องจากพบ HbE ได้ทั้งในผู้ป่วยมาลาเรียที่พบและไม่พบมาลาเรียขึ้นสมองอย่างไม่แตกต่างกัน (10) ขณะที่การศึกษาของ O'Donnell และคณะ กลับชี้ให้เห็นว่า HbE เพิ่มความไว (susceptibility) ต่อการติดเชื้อไวแวกซ์มากกว่าเซลล์ปกติ แต่สามารถต้านทานเชื้อพลาสมาได้ด้วยเหตุผล cross-immunity ระหว่างสปีชีส์ (11) อีกทั้งการศึกษาของ Williams และคณะ ที่พบว่าความสามารถในการป้องกันมาลาเรียขึ้นรุนแรงและการลดปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดของ HbAS จะลดลงเมื่อพบร่วมกับ α^+ -thalassemia อีกด้วย (12)

ด้วยผลการวิจัยที่อ้างอิงมาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า pathophysiology และความเสียหายของแอลฟาธาลัสซีเมียและ HbE ที่มีต่อการติดเชื้อมาลาเรียยังไม่ชัดเจน ซึ่งเป็นปัญหาและอุปสรรคต่อการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียเป็นอย่างมากด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาบทบาทของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่พบบ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คือ $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, SEA, FIL, และ $-\alpha^{CS}$ และ HbE ต่อการติดเชื้อมาลาเรียทั้งชนิดพลาสมาและไวแวกซ์โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางคลินิกและความเสี่ยงของโรคทั้งสองเพื่อประโยชน์ทางตรงในการอธิบายพยาธิสภาพของโรคมมาลาเรียภายใต้ภาวะแฝงของโรคธาลัสซีเมีย อีกทั้งเป็นประโยชน์ทางอ้อมต่อการนำผลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรง อีกทั้งเป็นการลดอัตราการตายของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นรุนแรงได้อีกทางหนึ่ง

1.2 คำถามของงานวิจัย

1.2.1 ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี ในผู้ป่วยมาลาเรียแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นอย่างไร

1.2.2 แอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี มีความสัมพันธ์ต่ออาการทางคลินิกของผู้ป่วยมาลาเรียแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี ในผู้ป่วยมาลาเรียแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

1.3.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางคลินิกของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี ในผู้ป่วยมาลาเรียแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

1.4 สมมติฐาน

1.4.1 ในการศึกษานี้พบความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยมาลาเรียแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้ไม่แตกต่างจากผู้ที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียในการศึกษาอื่นๆ

1.4.2 ผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีธาลัสซีเมียแฝงจะพบอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่าผู้ป่วยมาลาเรียที่มีธาลัสซีเมียแฝงร่วมด้วย

1.5 คำสำคัญ

α -Thalassemia

Hemoglobin E

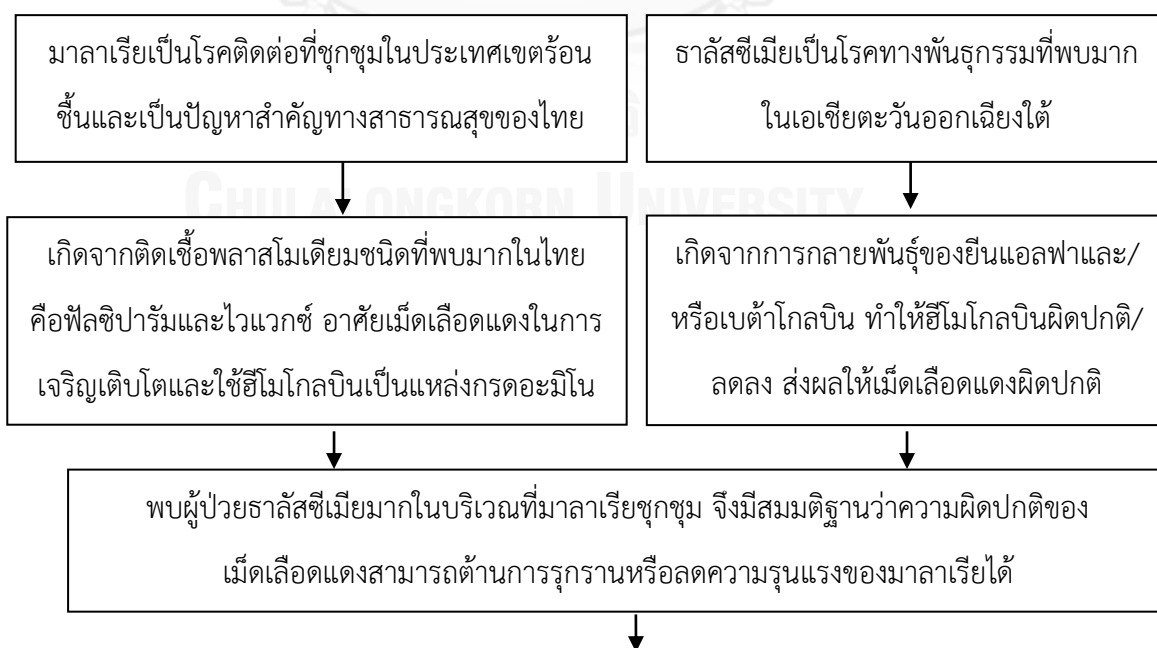
Malaria

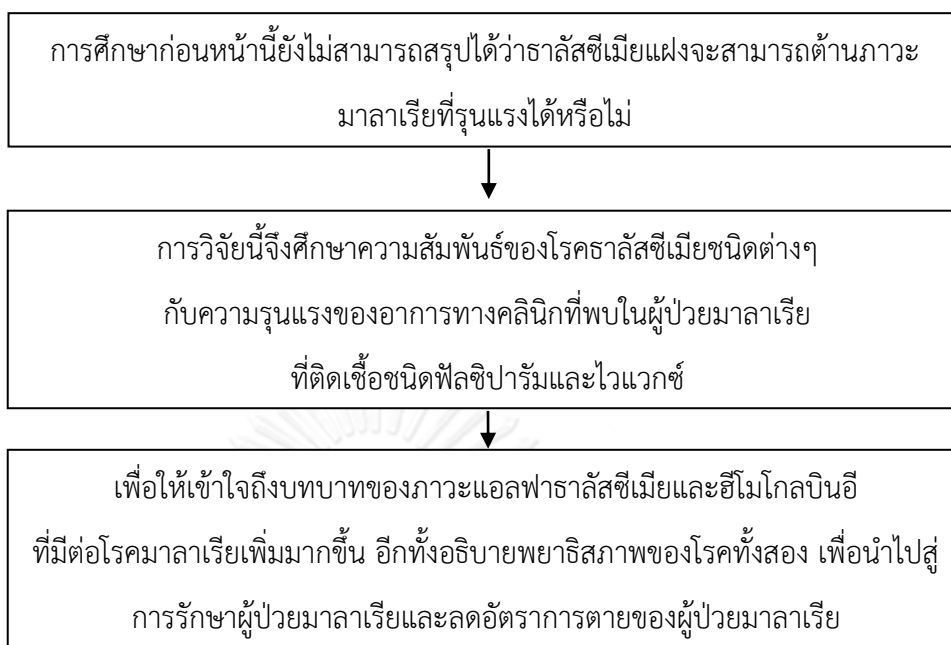
Southeast Asia

1.6 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงวิเคราะห์ (Analytical research)

1.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย





1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.8.1 ทราบบทบาทและความเสี่ยงของแอลฟาธาลัสซีเมียและ/หรือฮีโมโกลบินอีที่มีต่อพยาธิสภาพของผู้ป่วยมาลาเรียที่ติดเชืชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซ์

1.8.2 นำข้อมูลพยาธิสภาพของโรคทั้งสองมาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียเพื่อลดอัตราการตายของผู้ป่วยมาลาเรียขั้นรุนแรง

1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Compound heterozygous (พาหะผสม) หมายถึง คู่อัลลีล (allele) ของยีนเดียวกัน มีการกลายพันธุ์ที่ต่างกัน (มีภาวะ heterozygous ของ α -globin หรือ β -globin มากกว่า 1 ชนิด)

Double heterozygous (พาหะซ้อน) หมายถึง มีการกลายพันธุ์ที่คู่อัลลีลของยีนที่ต่างกัน (มีภาวะ heterozygous ของทั้ง α -globin และ β -globin)

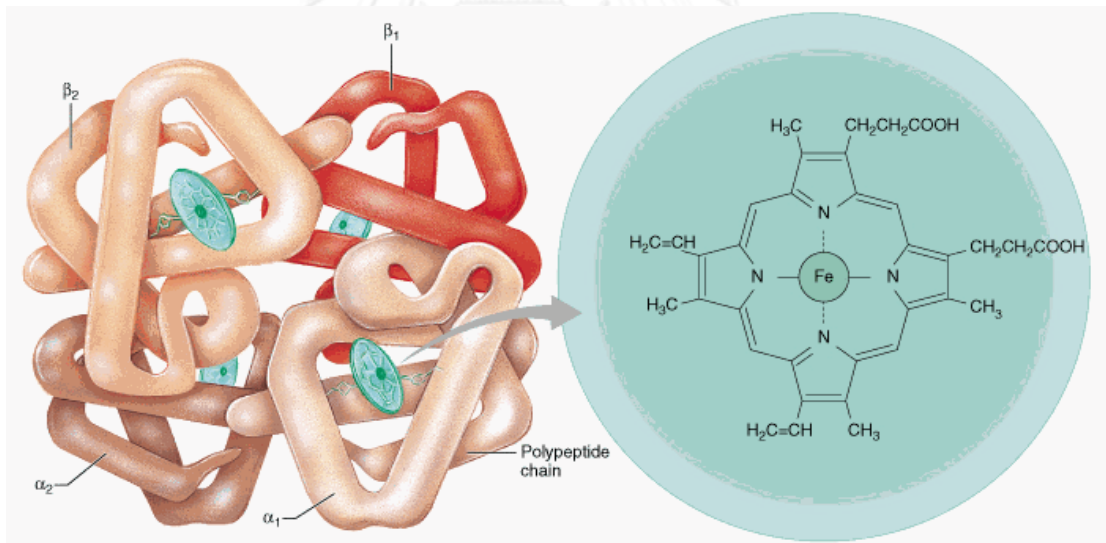
Moderately uncomplicated malaria หมายถึง ผู้ป่วยที่ยังไม่สามารถถูกจัดอยู่ในกลุ่มมาลาเรียขั้นรุนแรงได้ เนื่องจากมีค่าพารามิเตอร์ทางห้องปฏิบัติบางค่าเท่านั้นที่อยู่ในกลุ่มของมาลาเรียขั้นรุนแรงตามที่ WHO กำหนด เช่น มีค่า total bilirubin > 2.5 mg/dl, core body temperature > 40 °C หรือมี parasitemia > 100,000/ul แต่ไม่พบอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฮีโมโกลบิน

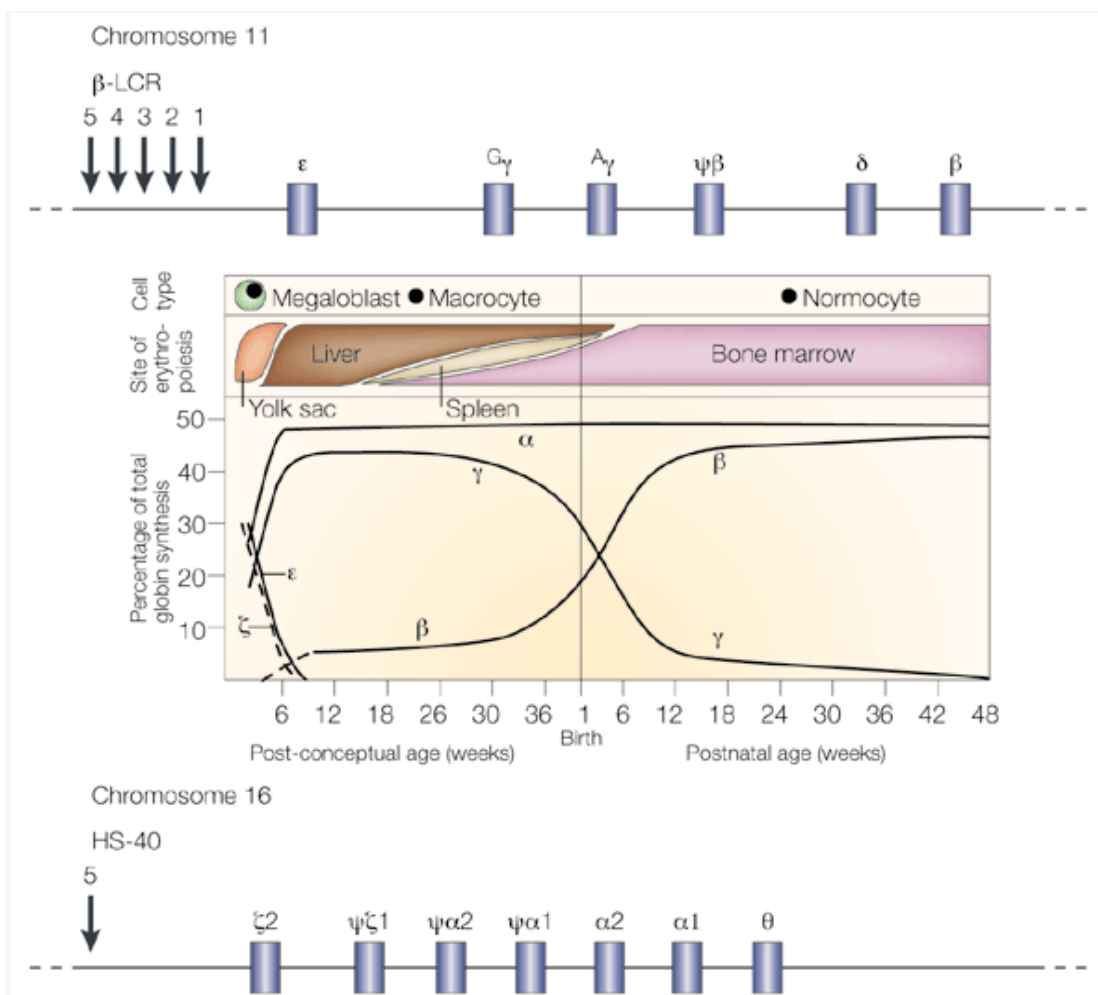
ฮีโมโกลบินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่พาออกซิเจน (oxygen) ไปสู่อวัยวะต่างๆ ของร่างกาย และพาคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) ไปกำจัดที่ปอดโมเลกุลของฮีโมโกลบินประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ดังแสดงในภาพที่ 1 (13) แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วยฮีม (heme) และโปรตีนโกลบิน โดยที่ฮีมมีพอร์ไฟริน (porphyrin) และธาตุเหล็ก (Fe) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งทำหน้าที่จับกับออกซิเจน และส่วนที่เป็นโปรตีนโกลบิน (globin chain) ซึ่งจะจับกัน 4 สาย (tetramer) โดยแบ่งเป็นแอลฟาโกลบิน (α -globin) 2 สาย ร่วมกับเบต้าโกลบิน (β -globin) 2 สาย หรือเดลต้าโกลบิน (δ -globin) 2 สาย ในผู้ใหญ่ หรือแกมมาโกลบิน (γ -globin) 2 สาย ในทารกในครรภ์ (fetus) (14)



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน

โกลบินแต่ละชนิดจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของชีวิต เริ่มตั้งแต่ช่วงการพัฒนาของตัวอ่อน (embryo) ทารกในครรภ์ (fetus) จนเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ (adult) โดยจะมีการสับเปลี่ยนการแสดงออกของยีนโกลบิน (globin gene switching) (15) ดังนั้นฮีโมโกลบินในระยะตัวอ่อน (embryonic Hb) ได้แก่ Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) และ Hb Portland ($\xi_2\gamma_2$) ฮีโมโกลบินในระหว่างตั้งครรภ์ (fetal Hb) ได้แก่ HbF ($\alpha_2\gamma_2$) ฮีโมโกลบินที่มีเล็กน้อยตั้งแต่

ใกล้คลอดไปจนถึงวันผู้ใหญ่ คือ HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) และฮีโมโกลบินที่สำคัญในวัยผู้ใหญ่ (adult Hb) คือ HbA ($\alpha_2\beta_2$) ดังแสดงในภาพที่ 2 (16)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีนโกลบินชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงของพัฒนาการ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

ธาลัสซีเมียมีรากศัพท์มาจากคำว่า thalassa ในภาษากรีก ซึ่งแปลว่า “ทะเล” และ haima ซึ่งแปลว่า “เลือด” เนื่องจากในขณะนั้นพบโรคนี้นี้มากในประชากรที่อยู่แถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังที่ถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรมเกิดจากความผิดปกติแบบยีนด้อย (autosomal recessive) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่สังเคราะห์สายโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ ยีนแอลฟาโกลบิน (α -globin gene) ยีนเบต้าโกลบิน (β -globin gene) และยีนเดลต้าโกลบิน (δ -globin) ผิดปกติไปเป็นผลให้มีการสร้างสายโกลบินได้น้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลย ส่วน

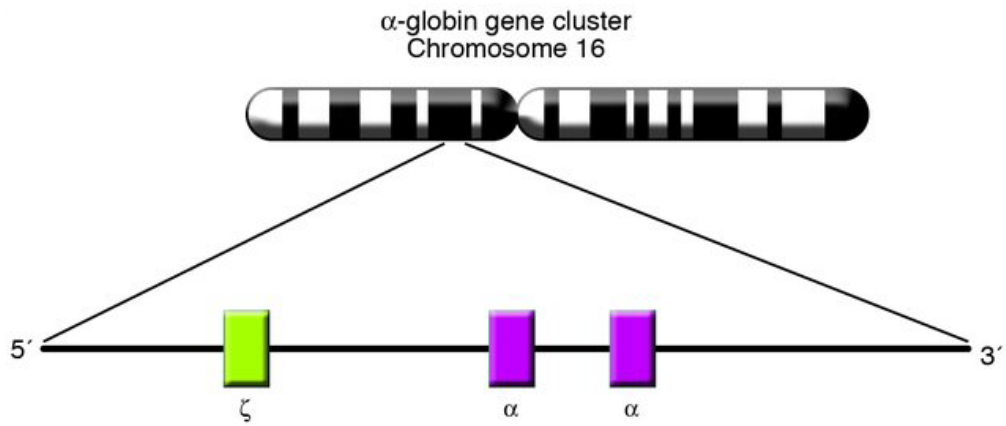
ฮีโมโกลบินผิดปกติ (hemoglobinopathies) เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินและยีนเบต้าโกลบินเช่นกัน แต่จะเป็นผลทำให้สายโกลบินที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของฮีโมโกลบิน (14)

2.3 ความชุกของโรคธาลัสซีเมียและ hemoglobinopathies ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

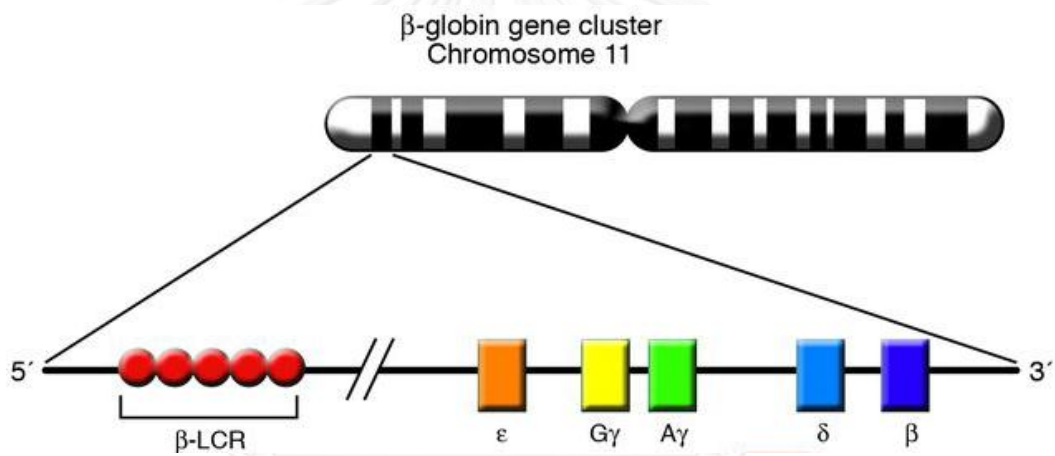
ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี 10 ประเทศ ประกอบด้วยประชากรที่มีความหลากหลายทางชาติพันธุ์อาศัยอยู่ประมาณ 400 ล้านคน สามารถพบแอลฟาธาลัสซีเมีย เบต้าธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี (HbE) และฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง (HbCS) ในความชุกที่สูง โดยพบความถี่ของแอลฟาธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 30-40 ทางตอนเหนือของประเทศไทยและลาว ร้อยละ 4.5 ในมาเลเซียและร้อยละ 5 ในหมู่เกาะฟิลิปปินส์พบขณะที่จะพบเบต้าธาลัสซีเมียได้ประมาณร้อยละ 1-9 และจะพบฮีโมโกลบินอีได้มากถึงร้อยละ 50-60 โดยจะพบมากบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างประเทศไทย ลาว และกัมพูชา ส่วนฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงพบได้ประมาณร้อยละ 1-8 โดยความผิดปกติของยีนเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมียได้มากกว่า 60 ชนิด ทำให้เอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นพื้นที่ที่มีความซับซ้อนของจีโนไทป์ของธาลัสซีเมียมากที่สุด (4)

2.4 อณูพันธุศาสตร์ของยีนแอลฟาโกลบิน และ ยีนเบต้าโกลบิน

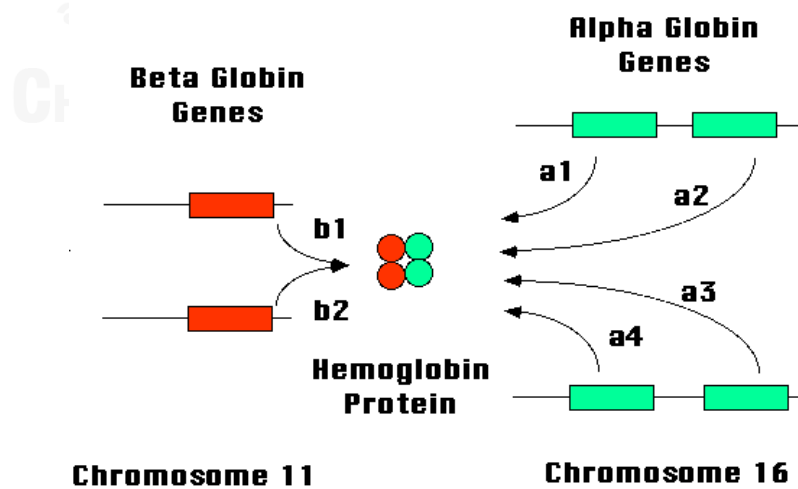
ยีนกลุ่มแอลฟาโกลบิน (α -globingene cluster) ขนาดประมาณ 70 กิโลเบส เรียงตัวอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 16 (16p13.3) ดังภาพที่ 3 (17) ซึ่งประกอบด้วยยีน ζ -globin, α 2-globin และ α 1-globin ตามลำดับจาก 5' ไป 3' ยีน α -globin ประกอบด้วย 3 แอ็กซอน (exon) และ 2 อินทรอน (intron) และสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ 141 ตัว ทั้งนี้ยีน α 2-globin และ α 1-globin มีลำดับเบสที่คล้ายกันมากหรือมากกว่าร้อยละ 96 และสามารถสร้างสายโกลบินที่มีโครงสร้างที่เหมือนกัน ส่วนยีนกลุ่มเบต้าโกลบิน (β -globingene cluster) มีขนาดประมาณ 60 กิโลเบส เรียงตัวอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 11 (11p15.4) ดังภาพที่ 4 (17) ซึ่งประกอบด้วยยีน ϵ -globin, γ -globin, $A\gamma$ -globin, δ -globin และ β -globin ตามลำดับจาก 5' ไป 3' ยีน β -globin ประกอบด้วย 3 แอ็กซอน และ 2 อินทรอน และสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ 146 ตัว ยีนกลุ่มแอลฟาและกลุ่มเบต้าต่างก็มีการแสดงออกร่วมกันอย่างสมดุลเพื่อประกอบเป็นฮีโมโกลบินที่สมบูรณ์สำหรับการขนส่งออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 5 (18) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนที่อยู่ในกลุ่มแอลฟา และยีนที่อยู่ในกลุ่มเบต้าจะมีการสับเปลี่ยนการแสดงออก (globin gene switching) ในแต่ละช่วงเวลาของพัฒนาการ (development) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 3 การจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบิน



ภาพที่ 4 การจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่มเบต้าโกลบิน



ภาพที่ 5 โกลบินทั้ง 4 สายที่สร้างจากยีนแอลฟาโกลบินและยีนเบต้าโกลบิน

2.5 การกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินและเบต้าโกลบิน

2.5.1 การกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน

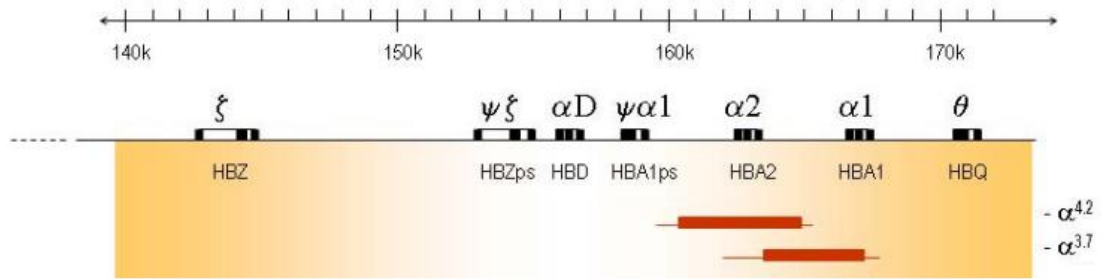
สายแอลฟาโกลบินสังเคราะห์มาจากยีน α -globin ทั้ง 4 loci บนโครโมโซมที่ 16 ความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการขาดหายไป (deletion) ของยีน โดยอาการของโรคจะแสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดตามจำนวนของยีนที่ขาดหายไป สามารถแบ่งได้ดังนี้

หากมีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 1 ยีน ($-\alpha/\alpha$) จะไม่แสดงอาการทางคลินิก และฮีโมโกลบินที่สร้างออกมาจะมีรูปแบบเหมือนปกติ (silent carriers) หากมีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 2 ยีน ($--/\alpha$) หรือ ($-\alpha/-\alpha$) กระบวนการสร้างแอลฟาโกลบินจะยังสามารถชดเชยได้ด้วย 2 ยีนที่เหลือ แต่อาจจะพบอาการของภาวะโลหิตจางเล็กน้อย (α -thalassemia trait) ซึ่งทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กกว่าปกติ (microcytic hypochromic anaemia) โดยการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินบนโครโมโซมเดียวกันทั้ง 2 ยีนหรือ *in cis* ($--/\alpha$) จะเรียกว่า α -thalassemia 1 หรือ α^0 -thalassemia ซึ่งจะพบได้มากในชาวเอเชียหรือในชาวเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของ α^0 -thalassemia จะทำให้มีโอกาสเกิดเป็น Hb Bart ($--/--$) หรือ Hb H diseases ($--/-\alpha$) ได้ แต่หากเกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินต่างโครโมโซมกัน หรือ *in trans* ($-\alpha/-\alpha$) จะเรียกว่า α -thalassemia 2 หรือ α^+ -thalassemia จะพบได้มากในชาวอัฟริกาในกรณีที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีน ($--/-\alpha$) จะทำให้การสร้างสายแอลฟาโกลบินลดลงอย่างมาก ทำให้สายเบต้าโกลบินที่มีมาก (β_4) จับตัวกันเป็น Hemoglobin H เป็นผลให้เกิดอาการของภาวะโลหิตจางที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กกว่าปกติเล็กน้อยจนถึงปานกลาง และเมื่อทำ peripheral blood smear จะเห็นเป็น target cells และ Heinz bodies (หรือ inclusion bodies: precipitated hemoglobin H) และในกรณีที่ยีนแอลฟาโกลบิน 4 ยีน ($--/--$) ขาดหายไปทั้งหมดสายแอลฟาโกลบินจะไม่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา เป็นผลให้เกิดการจับตัวกันของสายแกมมาโกลบิน (γ_4) เกิดเป็นฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ (Hemoglobin Bart's) ที่ไม่เสถียรและทำงานไม่ได้ ทำให้ทารกที่อยู่ในครรภ์เกิดภาวะโลหิตจาง ร่วมกับหัวใจโตและบวม น้ำ และเสียชีวิตได้ (15)

การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินเพียงหนึ่งยีน ที่เรียกว่า α -thalassemia 2 เช่น การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินขนาด 3.7 กิโลเบส (kilobase;kb) ($-\alpha^{3.7}$) และขนาด 4.2kb ($-\alpha^{4.2}$) ดังภาพที่ 6 (19) ทำให้มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินได้น้อยกว่าปกติ

การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินสองยีน ที่เรียกว่า α -thalassemia 1 เช่น การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินประมาณ 19 และ 34 กิโลเบส เรียกว่า α -thalassemia 1 ชนิด --^{SEA}, --^{FIL} ตามลำดับ ภาพที่ 6 ทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีนแอลฟาโกลบินได้

α -thalassemia 2

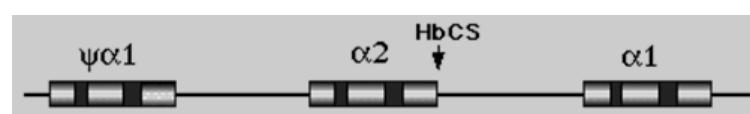


α -thalassemia 1



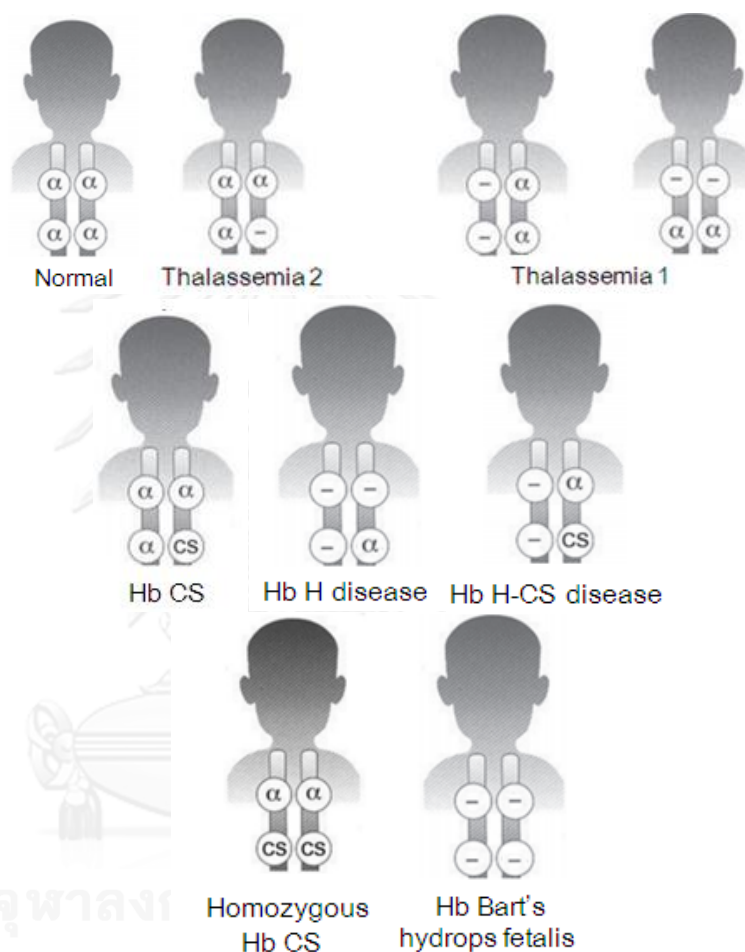
ภาพที่ 6 ตำแหน่งของยีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไปในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb Constant spring; HbCS) เป็นความผิดปกติของยีน $\alpha 2$ -globin แบบ point mutation ในตำแหน่งที่ 142 ดังภาพที่ 7 (20) เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่ง stop codon โดยการเปลี่ยนเบสจาก TAA ไปเป็น CAA ทำให้มีการแปลรหัสดีเอ็นเอในส่วนที่ตามปกติจะไม่ถูกแปล (untranslated sequence) ต่อไปอีก 31 ตัวจนกระทั่งถึงรหัสหยุดต่อไป จากปกติที่มีกรดอะมิโน 141 ตัว ไปเป็น 172 ตัว เกิดเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร เป็นผลให้มีอัตราการสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินลดลง ผู้ที่เป็น heterozygote จึงมีทั้งยีนที่ปกติ ($\alpha\alpha$) และยีนที่ผิดปกติ ($\alpha\alpha^{CS}$) อย่างละหนึ่งยีน ทำให้ผู้ที่เป็น heterozygote ($\alpha\alpha/\alpha\alpha^{CS}$) ไม่แสดงอาการใดๆ แต่ผู้ที่มียีนผิดปกติทั้งสองยีน ($\alpha\alpha^{CS}/\alpha\alpha^{CS}$) จะถือว่าเป็นโรคแต่จะมีอาการน้อยมาก อาจพบภาวะซีดและม้ามโตเล็กน้อย ซึ่งมีความรุนแรงเท่ากับ α -thalassemia 2 (21) ดังแสดงในภาพที่ 8 (22)



ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งของยีนที่สร้างฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb CS)

หากพบการกลายพันธุ์แบบ α -thalassemia 1 ทั้งสองอัลลีล เรียกว่าภาวะ homozygous α -thalassemia 1 หรือ โรคเด็กบวมน้ำจากฮีโมโกลบิน บาร์ต (Hb Bart's hydropsfetalis) และ หากพบ α -thalassemia 1 ร่วมกับ α -thalassemia 2 หรือ α -thalassemia 1 ร่วมกับ HbCS เรียกภาวะนี้ว่า Hb H disease ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของยีนแอลฟาโกลบิน

2.5.2 การกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินชนิดของเบต้าธาลัสซีเมียและ hemoglobinopathies

สายเบต้าโกลบินสังเคราะห์มาจากยีน 2 loci บนโครโมโซมที่ 11 หากมีความผิดปกติของยีนเบต้าโกลบิน จะมีผลทำให้ไม่สามารถสร้างสายเบต้าโกลบินได้ (β^0) หรือสร้างสายเบต้าโกลบินได้น้อยลง (β^+) ปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินแล้วกว่า 200 ชนิด โดยชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดคือฮีโมโกลบินอี (15)

ฮีโมโกลบินอี (β^E) ($\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu-Lys}}$) เป็นความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 ของสายเบต้าโกลบิน โดยเกิดจากการแทนที่ของเบส (base substitution) จากเบส GAG ไปเป็น AAG ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (missense mutation) จากกรดกลูตามิก (glutamic, Glu) ไปเป็นไลซีน (lysine, Lys) ได้เป็นสายโกลบินที่ผิดปกติ อีกทั้งการกลายพันธุ์ยังส่งผลทำให้เกิด splice site ที่ผิดตำแหน่ง (cryptic splice site) ทำให้ได้สาย mRNA ที่ผิดปกติ เป็นผลให้สร้างสายโกลบินได้น้อยลง (23) HbE จึงมีความรุนแรงเท่ากับ β^+ -thalassemia ในกรณีของเพศหญิงที่เป็น homozygous HbE จะมีอาการเม็ดเลือดแดงแตกเล็กน้อย (mild hemolytic anemia) ในขณะที่ผู้ที่เป็น heterozygous HbE (trait) จะไม่แสดงอาการ แต่หากเกิดร่วมกับ β -thalassemia (Hb E/ β^0 -thalassemia) จะแสดงอาการรุนแรงเหมือนกับ β -thalassemia major หรือ intermediate

การกลายพันธุ์ของ codon 17 (AAG-TAG) คือ adenine (A) ใน codon ที่ 17 ของยีนเบต้าโกลบินเปลี่ยนเป็น thymine (T) ทำให้เกิดตำแหน่ง stop codon หรือ nonsense mutation ส่งผลให้เกิด β^+ -thalassemia

การกลายพันธุ์ของ codon 41-42 (-TTCT) คือ นิวคลีโอไทด์ thymine (T), thymine (T), cytosine (C) และ thymine (T) ใน codon ที่ 41 และ 42 ขาดหายไป ทำให้เกิด frameshift mutation ส่งผลให้เกิด β^0 -thalassemia

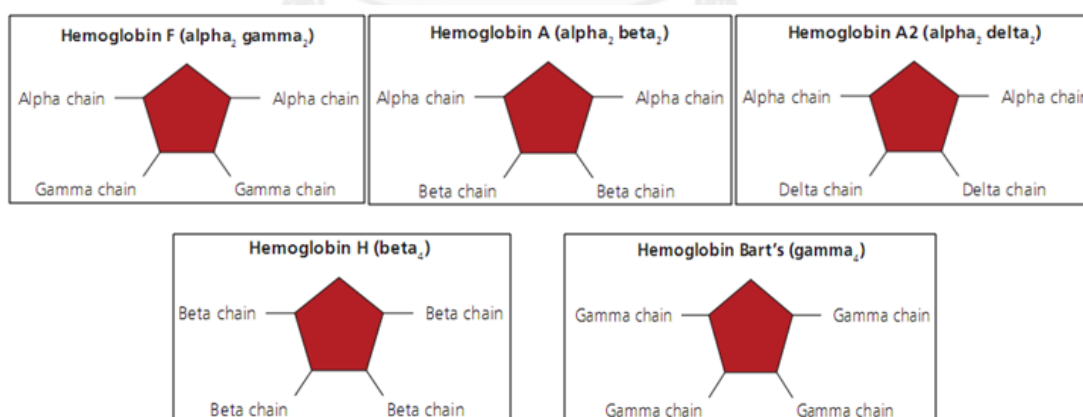
ฮีโมโกลบินเอส (HbS) ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu-Val}}$) หรือโรคโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงรูปเคียว (sickle cell anemia) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบสของสายเบต้าโกลบินที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 โดยเปลี่ยนจาก GAG ไปเป็น GTG เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจากกลูตามิกไปเป็น วาลีน (valine) ทำให้ได้ฮีโมโกลบินเอส (HbS) ออกมา โดยเม็ดเลือดแดงที่มี HbS จะมีรูปร่างคล้ายเคียว (sickle) มีความยืดหยุ่นน้อยลง และแตกได้ง่ายกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ (24)

ฮีโมโกลบินซี (HbC) ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu-Lys}}$) เป็นความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 ของสายเบต้าโกลบินโดยเปลี่ยนจากกรดกลูตามิก (glutamic, Glu) ไปเป็นไลซีน (lysine, Lys) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบส GAG ไปเป็น AAG ทำให้เกิดเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เห็นมีจุดกลมสีชมพูอยู่ตรงกลางคล้ายเป้า (target cells) (25) และแตกง่ายกว่าปกติ ทำให้ตับและม้ามโต และเกิดนิ่วในถุงน้ำดีได้ (23)

2.6 อาการของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และ hemoglobinopathies

ผู้ป่วยแอลฟาธาลัสซีเมียจะมีความผิดปกติที่สายแอลฟาโกลบิน ทำให้เกิดการจับรวมกันของสายเบต้าและแกมมาโกลบินที่มีอยู่มาก กลายเป็น HbH (β_4) และ Hb Bart's (γ_4) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินที่ผิดปกติดังแสดงในภาพที่ 9 (14) ส่วนผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียจะมีความผิดปกติที่สายเบต้าโกลบิน ทำให้มีสายแอลฟาโกลบินเหลืออยู่ ซึ่งจะสลายและตกตะกอนในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (normoblast) ขณะที่ hemoglobinopathies จะมีความผิดปกติในด้านโครงสร้างของสายโกลบิน เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ส่งผลต่อความเสถียรของฮีโมโกลบินที่สร้างได้ ทำให้เกิดเป็นเม็ดเลือดแดงที่ไม่สมบูรณ์ มีอายุสั้นกว่าปกติ และสูญเสียความสามารถในการขนส่งออกซิเจน

จากการที่ผู้ป่วยมีเม็ดเลือดแดงไม่แข็งแรง และแตกง่าย (hemolytic anemia) ทำให้เกิดการสะสมของธาตุเหล็กในร่างกายมากกว่าปกติ ปัสสาวะมีสีเข้ม ตาขาวมีสีเหลือง เกิดภาวะซีด ร่างกายขาดออกซิเจน จึงทำให้อวัยวะต่างๆ ในร่างกายทำงานได้ไม่ดีเท่าคนปกติ โดยจะมีการเจริญเติบโตช้า และเมื่อผู้ป่วยอยู่ในภาวะซีด ร่างกายจะพยายามสร้างเม็ดเลือดแดงออกมาชดเชยส่วนที่แตกไป ทำให้ไขกระดูกซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญในการสร้างเม็ดเลือดทำงานหนักมากขึ้น เป็นผลให้กระดูกหนาขึ้น โครงสร้างรูปหน้าเปลี่ยนแปลงไปทำให้หน้าผากนูนสูง โหนกแก้มชัดขึ้น แก้มนูนจนตาเอียง คางและกระดูกขากรรไกรกว้างขึ้น ฟันหน้ายื่น และจากการสร้างเม็ดเลือดแดงชดเชยในไขกระดูกมาก ทำให้กระดูกเปราะและหักง่าย ตับและม้ามโตจากการสร้างเม็ดเลือดแดงและจากการสะสมของธาตุเหล็ก ทำให้ท้องป่อง และสีผิวดำคล้ำจากการที่มีธาตุเหล็กไปสะสมที่ผิวหนัง (15, 26)



ภาพที่ 9 แสดงฮีโมโกลบินที่ปกติ (HbF, HbA, HbA₂) และ ฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ (HbH, Hb Bart's)

ลักษณะอาการของผู้เป็นโรคธาลัสซีเมียแบ่งตามความรุนแรงของอาการได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (2, 15)

2.6.1 กลุ่มที่มีความรุนแรงมากที่สุด เช่น โรคเด็กบวมน้ำจากฮีโมโกลบิน บาร์ต homozygous β -thalassemia และใน β -thalassemia/Hb E บางราย โดยผู้ป่วยจะเสียชีวิตทุกรายตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา หรือเมื่อคลอด หรือหลังคลอดได้ไม่นาน ผู้ป่วยจะมีอาการซีดมาก จำเป็นต้องได้รับเลือดเป็นประจำ และจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อยหากไม่ได้รับการรักษา

2.6.2 กลุ่มที่มีความรุนแรงปานกลางจนถึงรุนแรงมาก เช่น β -thalassemia/Hb E บางราย Hb H disease และ homozygous Hb Constant Spring (Hb CS) บางราย ในระยะแรกเกิดมักจะไม่แสดงอาการ แต่เริ่มมีอาการในช่วงอายุหนึ่งขวบ อาการที่สำคัญคือ ซีด อ่อนเพลีย ท้องป่อง ม้ามและตับโต กระดูกใบหน้าเปลี่ยน จมูกแบน โหนกแก้มสูง กระดูกบางเปราะหักง่าย ร่างกายแคระแกร็น เป็นต้น ผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มนี้อาจต้องรับเลือดบ้างเป็นครั้งคราว

2.6.3 กลุ่มที่รุนแรงน้อยจนถึงไม่มีการแสดงออกของอาการ เช่น ภาวะ heterozygote และ double heterozygote ทุกชนิด รวมทั้งภาวะ homozygote และ compound heterozygote บางชนิดที่ไม่เป็นโรค (non-disease thalassemia) ผู้ป่วยไม่ต้องเข้ารับการรักษา โดยจะมีอาการซีดเล็กน้อย อาจมีเหลืองร่วมด้วย ทำให้อาจเข้าใจผิดว่าเป็นโรคดีซ่านหรือโรคตับ แต่ถ้ามักมีการติดเชื้อหรือมีไข้ผู้ป่วยจะมีอาการซีดลงได้เร็วมาก

2.7 การตรวจโรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia screening) และ hemoglobinopathies

เป็นวิธีการตรวจเลือดเพื่อคัดกรองโรคในระยะที่ยังไม่ปรากฏอาการ โดยแบ่งเป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้นและการตรวจเพื่อยืนยัน

2.7.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) heterozygous ธาลัสซีเมีย ในปัจจุบันมี 3 วิธี (1, 2)

1. การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง (osmotic fragility test, OF) เป็นการวัดปริมาณการแตกของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.36 ซึ่งเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะแตกหมด แต่ heterozygous ธาลัสซีเมียจะแตกไม่หมด โดยปกติเม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จะคงสภาพปกติไว้ได้ แต่เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำเกลือลงเรื่อยๆ น้ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์บวมขึ้นจนแตกหมด การที่เม็ดเลือดแดงจะแตกง่ายหรือยากนั้นขึ้นกับอัตราส่วนของพื้นที่ผนังเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ซึ่งส่วนใหญ่คือฮีโมโกลบิน เช่น target cell (เม็ดเลือดแดงมีลักษณะเป็น cup shape) และ hypochromic cell ซึ่งจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าปกติจึงทำให้เซลล์แตกยาก ในขณะที่ spherocyte (เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างเป็นทรง

กลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ) เซลล์จะแตกง่าย ดังนั้นเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและ heterozygous ธาลัสซีเมียที่มี target cell และ hypochromic cell จึงแตกยาก แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะเป็น hypochromic cell จากสาเหตุอื่น เช่น ภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก หรือเป็น target cell ในผู้ป่วยโรคตับ ซึ่งสามารถให้ผลบวกปลอมได้

2. การตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดง (red cell indices) ประกอบด้วยการดูค่า MCV (mean corpuscular volume) และ MCH (mean corpuscular hemoglobin) heterozygous ธาลัสซีเมียจะมีค่า MCV ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean - 2 S.D) ส่วนค่า MCH ในผู้ที่เป็ heterozygote จะมีค่าต่ำกว่า 27 pg (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย MCV (mean corpuscular volume) ตามช่วงอายุ

อายุ	ค่าเฉลี่ย MCV (fl) (-2 S.D.)
Birth (cord blood)	108 (98)
1 to 30 days	108 (95)
1 week	107 (88)
2 weeks	105 (86)
1 month	104 (85)
2 months	96 (77)
3 to 6 months	91 (74)
0.5 to 2 years	78 (70)
2 to 6 years	81 (75)
6 to 12 years	86 (77)
12 to 18 years	
Female	90 (78)
Male	88 (78)
Adults	
Female	90 (80)
Male	90 (80)

3. การทดสอบฮีโมโกลบินไม่เสถียรโดยการตกตะกอนสีด้วยดีซีพีโอ (dichlorophenol-indolphemol (DCPI) precipitation test) ใช้ในการตรวจฮีโมโกลบินอี (HbE) โดยสี DCPI สามารถทำให้โมเลกุลของฮีโมโกลบินไม่เสถียร (unstable hemoglobin) เกิดการสลายตัวและตกตะกอน ทำให้ตรวจหาฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ ได้ เช่น HbE และ HbH โดยสามารถตรวจกรอง heterozygous Hb E ได้มากกว่าร้อยละ 95

2.7.2 การตรวจยืนยันโดยวิธีมาตรฐาน (2)

1. การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing & quantitation) ใช้ตรวจ heterozygous β -thalassemia โดยตรวจวัดปริมาณ HbA₂ ซึ่ง heterozygous ชาติส์ซีเมีย จะมีค่า HbA₂ มากกว่าร้อยละ 3.5 และสามารถตรวจฮีโมโกลบินที่ผิดปกติได้ เช่น Hb E และ Hb CS

2. การตรวจ serum ferritin เพื่อแยกภาวะขาดเหล็กออกจาก heterozygous ชาติส์ซีเมีย

3. การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

สามารถใช้ในการวินิจฉัยแยกผู้ที่เป็น heterozygous thalassemia, homozygous thalassemia และผู้ที่มียีนปกติออกจากกันได้หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) จะเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template), เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนสูง, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers ที่จำเพาะ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ โดยในแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1). Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว 2). Annealing เป็นขั้นตอนที่ oligonucleotide primers จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (primer-template annealing) ตรงบริเวณที่ลำดับเบส complementary กัน 3). Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก primer ในทิศทาง 5' ไปยังด้าน 3' โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนสูง การสังเคราะห์จะเป็นไปตามลำดับขั้นทั้ง 3 ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 - 30 รอบ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก สามารถใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบการขาดหายไปของยีน (deletion) เช่น α ^{SEA}, α ^{FIL}, α ^{4.2} และ α ^{3.7} ได้โดยใช้วิธี gap PCR ส่วนการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ point mutation เช่น HbE และ HbCS จะใช้วิธี PCR-RFLP ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะในการแยกผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ออกจากคนปกติ โดยจะสามารถแยกได้ทั้งแบบ homozygous และ heterozygous

2.8 มาลาเรีย (Malaria)

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่มียุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะโดยนำพาเชื้อปรสิตพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) มาสู่ผู้ป่วย ซึ่งมี 5 ชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์คือ ฟัลซิพารัม (*P. falciparum*) ไวแวกซ์ (*P. vivax*) มาลาเรียอี (*P. malariae*) โอวาเล่ (*P. ovale*) และ โนว์ลิไซ (*P. knowlesi*) (27) มาลาเรียเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียสูง ดังแสดงในภาพที่ 10 (28) ในปี ค.ศ. 2010 องค์การอนามัยโลกพบผู้ติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 225 ล้านคนทั่วโลก และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 781,000 คนจากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซ์สามารถพบกระจายอยู่ทั่วโลก รวมทั้งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขณะที่มาลาเรียอีจะพบในแถบแอฟริกา โอวาเล่พบในบริเวณแอฟริกาตะวันตก และโนว์ลิไซมักพบในประเทศมาเลเซีย ไทย และพม่า (28)



ภาพที่ 10 การกระจายตัวของโรคมมาลาเรียในปี ค.ศ. 2010

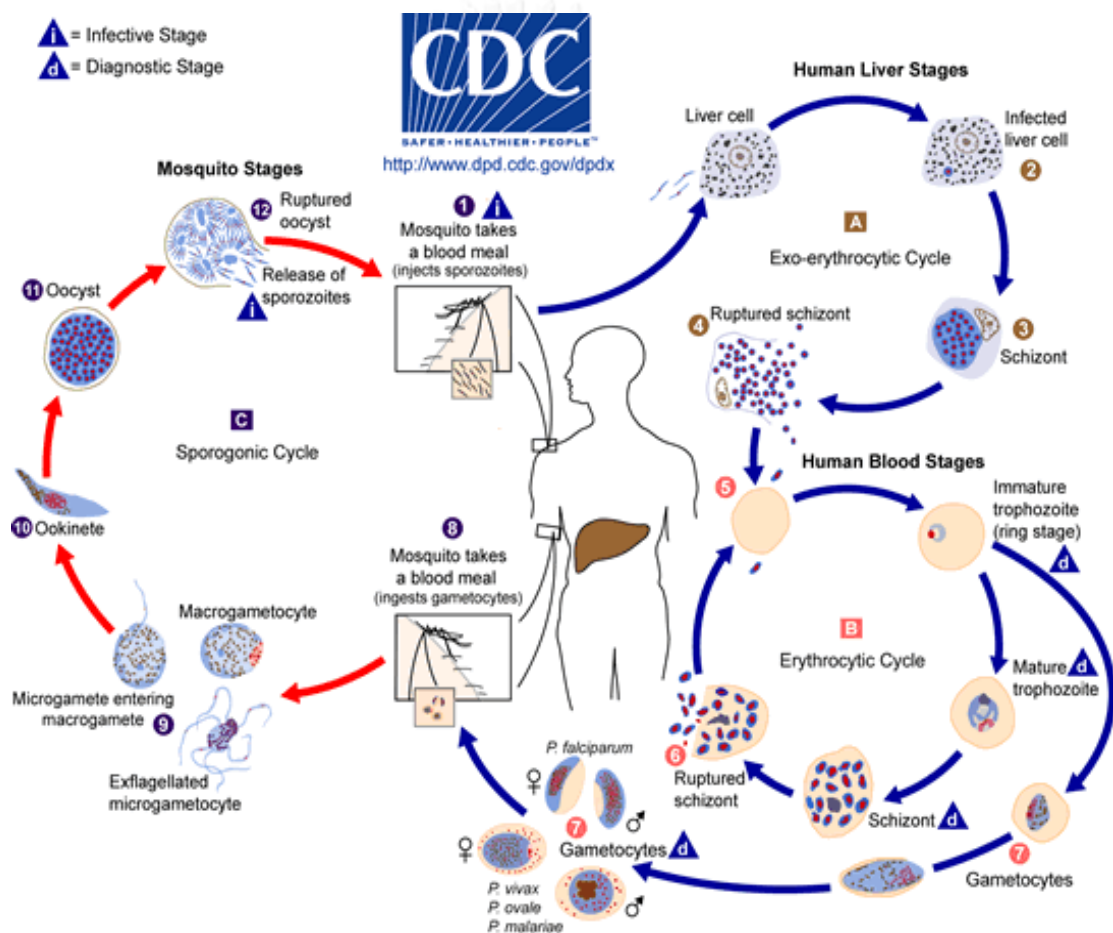
2.9 วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม (17, 29)

เชื้อปรสิตพลาสโมเดียมเป็น intracellular protozoa ที่อาศัยภายในเซลล์ วงจรชีวิตของเชื้อจะมี 2 วงจร คือ ในยุงก้นปล่อง ซึ่งเป็นพาหะของโรคมมาลาเรียจะเป็นแบบ sexual cycle และในคนจะเป็นแบบ asexual cycle ดังแสดงในภาพที่ 11 (29) ในต่อมน้ำลายของยุง เชื้อพลาสโม-

เดียมจะอยู่ในรูป sporozoite เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้ออยู่มากัดคนก็จะปล่อย sporozoite เข้าสู่กระแสเลือดของคน [ระยะที่ 1] จากนั้น sporozoite จะเข้าสู่ parenchymal cell ของเซลล์ตับ [ระยะที่ 2] และเจริญไปเป็น merozoite จำนวนมาก ต่อมาเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ schizont เรียก ระยะที่เชื้อเจริญเติบโตในเซลล์ตับว่า exo-erythrocytic cycle [ระยะที่ 3] เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว merozoite จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือด และรุกรานเข้าสู่เม็ดเลือดแดง [ระยะที่ 4-5] ช่วงชีวิตของเชื้อที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงเรียกว่า ระยะ erythrocytic cycle โดยเชื้อจะเจริญเติบโตภายในเม็ดเลือดแดงเป็นระยะต่างๆ ดังนี้ ring form (immature trophozoite), mature trophozoite และ schizont ซึ่งภายในมี merozoite อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตกออกและปล่อย merozoite ออกมา [ระยะที่ 6] ทำให้ merozoite สามารถเข้ารุกรานเซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่และเริ่มวงจรชีวิตในเม็ดเลือดแดงต่อไปเรื่อยๆ ในระหว่างที่เชื้อรุกรานเซลล์เม็ดเลือดแดง เชื้อจะย่อยฮีโมโกลบินเพื่อใช้เป็นแหล่งสร้างกรดอะมิโน (amino acid) ของเชื้อทำให้เกิด free heme จากการสลายฮีโมโกลบิน ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อ ดังนั้นเชื้อจึงต้องมีวิธีป้องกันความเป็นพิษของ free heme โดยใช้เอนไซม์ heme polymerase ที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น เปลี่ยน free heme ให้เป็น haemozoin ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเชื้อ เมื่อเม็ดเลือดแดงแตก merozoite ที่ออกมาจะเข้าไปยังเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไปเป็นวงจร ขณะเดียวกันเชื้อ merozoite บางส่วนก็จะพัฒนาไปเป็น gametocytes เพศผู้และเพศเมีย [ระยะที่ 7] ดังนั้นเมื่อยุงก้นปล่องดูดเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่มีเชื้อในระยะนี้ จะส่งผลให้ยุงจะได้รับเชื้อในระยะสืบพันธุ์ หรือเรียกว่าระยะ sexual cycle [ระยะที่ 8] โดยเชื้อจะปฏิสนธิกลายเป็น zygotes [ระยะที่ 9] ภายในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงจากนั้นจะพัฒนาต่อไปเป็น ookinetes [ระยะที่ 10] ซึ่งจะไชผ่านผนังทางเดินอาหารของยุงในขณะที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ oocysts [ระยะที่ 11] เมื่อเชื้อโตเต็มที่ก็จะปล่อย sporozoite ออกมาอยู่ในต่อมน้ำลายของยุง [ระยะที่ 12] ดังนั้นขณะที่ยุงดูดเลือดจากคน เชื้อในระยะ sporozoite ที่อยู่ในน้ำลายของยุงก็จะถูกส่งเข้าสู่ร่างกายคนต่อไป [ระยะที่ 1] ซึ่งเรียกระยะที่เชื้อมีวงจรชีวิตอยู่ในยุงว่า sporogonic cycle

แต่อย่างไรก็ตาม วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียมแต่ละสปีชีร์ก็จะมี ความแตกต่างกันในบางระยะ เช่น ในระยะ exo-erythrocytic cyclesporozoite ของไวแวกซ์ และโอวาเล่ ที่เข้าสู่เซลล์ตับ จะเจริญเป็น hypnozoite และแฝงตัวอยู่ในเซลล์ตับ แต่เมื่อเวลาผ่านไปซึ่งอาจใช้เวลาเป็นเดือนหรือปี hypnozoite จะปล่อย merozoite ออกมาและเข้าสู่ระยะ erythrocytic cycle ได้อีกซึ่งต่างจากมาลาเรียอี โนว์ลิไซ และฟัลซิพารัม ดังนั้นในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่ติดเชื้อชนิดไวแวกซ์ และโอวาเล่ จึงต้องใช้ยาฆ่า hypnozoite ร่วมด้วย เพื่อไม่ให้เกิดการกลับมาเป็นซ้ำอีก (relapse)

นอกจากนี้การแตกของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยยังมีความจำเพาะต่อเชื้อซึ่งปกติเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยมาลาเรียจะแตกพร้อมๆ กัน โดยหากเป็นเชื้อชนิดโนวัลไซ เม็ดเลือดแดงจะแตกทุก 24 ชั่วโมง เชื้อชนิดฟลซิพาร์มไวแวกซ์ และโอวาเล่ เม็ดเลือดแดงจะแตกทุกๆ 48 ชั่วโมง เป็นผลให้เกิดไข้วันเว้นวัน เรียก tertian malaria ส่วนเชื้อชนิดมาลาเรียอื่นนั้นเม็ดเลือดแดงจะแตกทุก 72 ชั่วโมง ทำให้เกิดไข้วันเว้นสองวัน เรียก quatrain malaria



ภาพที่ 11 วงจรชีวิตของเชื้อปรสิตพลาสมาเดียม

2.10 ลักษณะอาการของผู้ป่วยมาลาเรีย

อาการแสดงของมาลาเรียในระยะแรกจะไม่มีลักษณะพิเศษที่บ่งชี้ว่าเป็นมาลาเรีย ส่วนมากผู้ป่วยจะมีอาการคล้ายกับเป็นไข้หวัด คือ มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัวและกล้ามเนื้อ อาจมีอาการคลื่นไส้ และเบื่ออาหารร่วมด้วย โดยอาการเหล่านี้จะเป็นในระยะเวลาสั้นๆ เพียงหนึ่งหรือ

หลายวันได้ ขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่มีต่อเชื้อมาลาเรีย อาการของโรคมลาเรียแบ่งออกเป็น 3 ระยะ (30) คือ

1. ระยะสั้น ผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่นตามตัวและปาก ผิวหนังซีด แห้งหายาบ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 15 – 60 นาที โดยระยะนี้จะตรงกับการแตกของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ
2. ระยะมีไข้ ผู้ป่วยจะมีไข้สูง อาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนร่วมด้วย หน้าแดง ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 2 – 6 ชั่วโมง
3. ระยะเหงื่อออก ผู้ป่วยจะมีเหงื่อออกจนชุ่มที่นอน

อาการที่รุนแรงในผู้ป่วยมาลาเรียมักเกิดจากเชื้อชนิดฟัลซิพารัม โดยสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตส่วนใหญ่ เกิดจากภาวะแทรกซ้อน เช่น ภาวะซีด ไข้สูง ม้ามแตก เป็นต้น ซึ่งมักเกิดในเด็กหรือในผู้ใหญ่โดยเฉพาะในกลุ่มนักท่องเที่ยวที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อมาลาเรียเลย ตัวอย่างของมาลาเรียที่มีอาการรุนแรงตาม คำนิยามขององค์การอนามัยโลก (WHO) (31) ได้แก่

1. มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ผู้ป่วยจะซึมลงจนถึงขั้นหมดสติ (coma) ภายใน 1 – 2 วัน หรือทันทีใน 1 - 2 ชั่วโมงและอาจมีอาการชักร่วมด้วยโดยประเมินความรุนแรงของ coma ได้โดย Glasgow coma scale ในผู้ใหญ่หรือ Blantyre coma scale ในเด็กในภาวะ impairment of consciousness ที่น้อยกว่า unrousable coma
2. ภาวะซีดมาก (severe anaemia) จากการแตกของเม็ดเลือดแดงทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ เนื่องจาก reticuloendothelial activity เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่ม้าม และจากการสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง จากภาวะ bone marrow hypoplasia และ dyserythropoiesis ทำให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีประสิทธิภาพ เกิดเป็นภาวะโลหิตจาง (normocytic anemia) โดยมีค่า Hb < 5 g/dl (Hct < 15%) และมี parasitemia > 10,000/ul
3. มาลาเรียร่วมกับภาวะไตวาย (acute renal failure) มีค่า urine output < 400 ml/24 h (น้อยกว่า 12 ml/kg ในเด็ก) และ serum creatinine > 3 mg/dl
4. ภาวะปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) อาจเกิดได้ทุกเมื่อในผู้ป่วยมาลาเรียที่รุนแรง โดยเฉพาะในหญิงมีครรภ์จะพบได้สูง และพบได้น้อยในเด็ก ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอาจเกิดจากภาวะ adult respiratory distress syndrome (ARDS) และอาจเกิดจากการที่มีอัลบูมินในเลือดต่ำ การให้สารละลายน้ำเข้าสู่หลอดเลือดมากเกินไป หรือจากการทำลายหลอดเลือดฝอยโดยตรงจากเชื้อมาลาเรีย

5. ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) มี whole blood glucose < 40 mg/dl เกิดจากการที่ตับผลิตน้ำตาลลดลง แต่ร่างกายต้องการใช้น้ำตาลมากขึ้นในช่วงที่ป่วย จึงทำให้เกิดอาการหน้ามืด เหงื่อออก และใจสั่น แต่ถ้าระดับน้ำตาลต่ำมาก อาจซึมถึงขั้นโคม่า ซึ่งจะมีอาการเหมือนภามาลาเรียขึ้นสมอง

6. ภาวะช็อคมีค่า systolic blood pressure < 70 mmHg หรือ core skin temperature difference > 18 °F (10 °C)

7. ภาวะเลือดออกผิดปกติจากเหงือก จมูก และทางเดินอาหาร มี DIC > 2 ครั้งใน 24 ชั่วโมง ถึงแม้จะฉีดตัวให้เย็นแล้ว

8. ภาวะเลือดเป็นกรด (metabolic acidosis) เกิดจากการที่อวัยวะต่างๆในร่างกายได้รับออกซิเจน และน้ำตาลลดลง ทำให้เซลล์ผลิตกรดขึ้นมา ผู้ป่วยจะมีอาการซึม หอบหายใจลึกแต่ได้ยินเสียงปอดปกติจาก Kussmaul's breathing อาจเกิดจากการที่เลือดไปเลี้ยงหลอดเลือดได้ไม่ดี หรือเป็นกรดจากแลคติก มักพบภาวะเลือดเป็นกรดร่วมกับภาวะไตวายในผู้ใหญ่ ซึ่งถ้าไม่รีบรักษาจะทำให้ความดันโลหิตลดลงหรือเกิดภาวะช็อคตามมาได้ เกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยคือ plasma bicarbonate < 15 mmol/L หรือ base excess ต่ำกว่า -10 หรือ arterial blood pH < 7.35

9. ภาวะปัสสาวะดำ (hemoglobinuria) อาจเกิดจากผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ได้รับยาที่กระตุ้น oxidative stress ไข้ปัสสาวะดำมักเกิดขึ้นไม่นานและหายไปโดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนเหลืออยู่

10. ภาวะกล้ามเนื้ออ่อนแรง (prostration) ไม่สามารถนั่งหรือรับประทานอาหารได้เหมือนปกติ เป็นอาการที่ใช้สำหรับเด็ก

11. ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (hyperparasitemia) มีปริมาณ parasitemia $> 4\%$ มักอันตรายในผู้ป่วย non-immune แต่ไม่อันตรายในผู้ป่วย semi-immune ถ้า parasite $> 20\%$ ถือว่าอยู่ในภาวะมาลาเรียขั้นรุนแรง

12. กลุ่มอาการทางสมองหลังจากการเป็นโรคมมาลาเรีย จะพบเชื้อชนิดฟิลชิปาร์มในหลอดเลือดสมองจากการชันสูตรสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตแล้ว

2.11 การตรวจวินิจฉัยมาลาเรีย

การตรวจวินิจฉัยมาลาเรียทำได้โดยการตรวจทางคลินิกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งการวินิจฉัยโรคมมาลาเรียที่เป็นมาตรฐาน (gold standard test) ได้แก่ การตรวจพบเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงจากการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มโลหิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ (blood film) ทั้งที่เป็นแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin film) เพื่อดูเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย และชนิดหนา (thick film) เพื่อใช้ในการดูความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย เป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ และตรวจได้ง่าย สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ทั้งฟิล์มเลือดชนิดบางและหนา

การวินิจฉัยโรคมมาลาเรียโดยอาศัยลักษณะอาการทางคลินิก ผู้ป่วยมาลาเรียจะไม่มีลักษณะอาการทางคลินิกเฉพาะที่สามารถบอกได้ว่าเป็นโรคมมาลาเรียโดยจะมีลักษณะอาการทางคลินิกคล้ายกับโรคอื่น เช่น ไข้หวัด ไข้เลือดออก หรือทัยฟอยด์ เป็นต้น แต่จะมีลักษณะเฉพาะของไข้ที่เกิดจากเชื้อมาลาเรียคือจะมีไข้สูงเป็นพักๆ ในเวลาเดิม ซึ่งเกิดจากเชื้อจำนวนมากแต่ในเวลาเดียวกัน แต่ในผู้ป่วยบางรายอาจจะไม่มีไข้สูงเป็นพักๆ เนื่องจากผู้ป่วยได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายหลายชุด เพราะถูกยุงกัดหลายครั้ง ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกไม่พร้อมกัน ทำให้มีอาการไข้ในระยะแรกที่แตกต่างกัน อาจทำให้วินิจฉัยผิดว่าไม่ใช่มาลาเรียได้ โดยอาการทางคลินิกของผู้ป่วยมาลาเรียแบ่งได้ 2 ชนิด คือ ผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อน (uncomplicated malaria) และมาลาเรียที่มีภาวะแทรกซ้อน (complicated malaria) หรือมาลาเรียที่รุนแรง (severe malaria)

การวินิจฉัยมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการดังนี้

1. การตรวจทางปรสิตวิทยาเพื่อหาเชื้อมาลาเรียในเลือดเป็นการตรวจแยกชนิดของเชื้อและระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลังการย้อมสีเม็ดเลือดแดง โดยสีย้อมที่เป็นที่นิยมคือสีิมซา (Giemsa stain) ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ย้อมฟิล์มเลือดทั้งชนิดหนาและบาง
2. การตรวจทางอิมมูโนวิทยาเพื่อหาแอนติบอดี (antibody) การตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย สามารถดูได้ทั้งผู้ที่ติดเชื้ออยู่ในร่างกาย และผู้ที่เคยได้รับเชื้อมาก่อน แต่เนื่องจากการตอบสนองของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อมาลาเรียมีความผันแปรต่างกันในแต่ละบุคคลจึงไม่สามารถกำหนดมาตรฐานในการแปลผลจากระดับแอนติบอดีที่พบว่า การติดเชื้ออยู่ในภาวะใดรวมทั้งไม่สามารถใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค แต่เป็นวิธีที่มีประโยชน์ในงานด้านระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรีย การตรวจจะใช้วิธี Immunofluorescent antibody test (IFAT), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ Indirect hemagglutination test (IHA)
3. การตรวจทางอิมมูโนวิทยาเพื่อหาแอนติเจน (antigen) การตรวจจะใช้วิธี Radioimmunoassay (RIA), Immunoradiometric assay (IRMA) และ Enzyme-linked

immunosorbentassat (ELISA) โดยการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียจะใช้บอกสถานะของการติดเชื้อในปัจจุบัน

4. การตรวจทางอณูชีววิทยาเพื่อหาสารพันธุกรรมเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงกว่าวิธีอื่นๆ สามารถตรวจแยกชนิดของเชื้อได้ทั้ง 4 ชนิด วิธีการทางอณูชีววิทยาที่มีการประยุกต์ใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคมาลาเรียมีหลายวิธี เช่น Nucleic acid hybridization และ Polymerase chain reaction (PCR) เป็นต้น

2.12 มาลาเรียและธาลัสซีเมีย

ในปี ค.ศ. 1949 Haldane ได้ตั้งสมมติฐานว่าผู้ป่วยที่มีภาวะแฝงของความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดง เช่น ธาลัสซีเมียอาจป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้ (5) เพราะจากการศึกษาระบาดวิทยาของโรคมาลาเรียและอุบัติการณ์ของผู้ป่วยที่มียีนแฝงของโรคที่เกิดจากความผิดปกติของโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง มักจะพบว่าในพื้นที่เดียวกันจะมีอัตราการของการเป็นโรคทั้งสองกลุ่มสูง เมื่อวิเคราะห์จากวงจรชีวิตของเชื้อจะพบว่าเมื่อเชื้อพลาสโมเดียม บุกรุกเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน เชื้อจะใช้ฮีโมโกลบินเป็นแหล่งสร้างกรดอะมิโน (amino acid) ดังนั้นเมื่อฮีโมโกลบินผิดปกติไป ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีสภาวะแวดล้อมทั้งภายในเซลล์และโครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนไปจากเดิม ย่อมส่งผลต่อเชื้อพลาสโมเดียม ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนโกลบินที่ก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมียนั้นเป็นกลไกทางพันธุกรรมที่ช่วยสร้างสมดุลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ต่อการป้องกันหรือลดความรุนแรงต่อมาลาเรีย

เพื่อสนับสนุนหรือโต้แย้งสมมติฐานของ Haldane จึงมีการทดสอบด้วยการศึกษาทั้งทางระบาดวิทยา และการทดลอง (*in vitro*) อาทิเช่น การศึกษาทางระบาดวิทยาในผู้ป่วยเด็กในประเทศแกมเบีย (The Gambia) พบว่าผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์ชนิด α -thalassemia จะไม่พบเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (32) ขณะที่ในประเทศไลบีเรีย (Liberia) พบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แฝงชนิด β -thalassemia มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่พบการกลายพันธุ์แฝงชนิด β -thalassemia (33) นอกจากนี้ Mockenhaupt และคณะ ยังแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แฝงชนิด α -thalassemia ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมมักจะมีอาการไม่รุนแรงเท่ากับผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่พบการกลายพันธุ์แฝงชนิด α -thalassemia (34) ต่อมา Chotivanich และคณะ พบว่าการกลายพันธุ์แฝงชนิดฮีโมโกลบินอี (HbE) สามารถลดการบุกรุกของเชื้อฟัลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติที่ไม่พบการกลายพันธุ์แฝงชนิดฮีโมโกลบินอี (8) เป็นเพราะความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าการ

ป้องกันการบุกรุกของเชื้อฟัลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงที่พบการกลายพันธุ์แบบ homozygous ฮีโมโกลบินอีกกลับส่งผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม Chotivanich และคณะ ยังพบว่า การกลายพันธุ์แบบ homozygous ฮีโมโกลบินอี สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อฟัลซิพารัมได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งการกลายพันธุ์แฝง และแบบ homozygous ของฮีโมโกลบินอีต่างก็สามารถลดความรุนแรงของเชื้อพลาสโมเดียมได้ โดยอาศัยวิธีที่ต่างกัน (8) นอกจากนี้การศึกษาทางพันธุศาสตร์ ยังชี้ให้เห็นว่าแอลฟาธาลัสซีเมียได้ถูกคัดเลือกตามธรรมชาติในแอฟริกา และฮีโมโกลบินอีได้ถูกคัดเลือกตามธรรมชาติในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เพื่อช่วยป้องกันโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้ (8, 34)

จากการทดลอง (*in vitro*) โดย Michael และคณะ พบว่าเม็ดเลือดแดงทั้งชนิด heterozygous ($-\alpha/\alpha\alpha$), heterozygous ($--/\alpha$) และ homozygous ($-\alpha/\alpha$) ที่ติดเชื้อฟัลซิพารัม จะสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะ (cytoadherence) กับ microvascular endothelial cells (MVECs) และ monocytes ที่ใช้ *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1 (PfEMP1) เป็น antigenic ligand ที่สำคัญในการหลบซ่อนระบบภูมิคุ้มกันของ host (7) แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ให้ผลขัดแย้งกัน เช่น Naka และคณะ พบว่าฮีโมโกลบินอีไม่สามารถลดมาลาเรียขึ้นสมองที่เกิดจากเชื้อฟัลซิพารัมได้ เนื่องจากพบฮีโมโกลบินอีได้ทั้งในผู้ป่วยมาลาเรียที่พบและไม่พบมาลาเรียขึ้นสมองอย่างไม่แตกต่างกัน (10) อีกทั้งในการศึกษาของ Donnell และคณะ ชี้ให้เห็นว่าฮีโมโกลบินอีเพิ่มความไว (susceptibility) ต่อการติดเชื้อไวแวกซ์มากกว่าเซลล์ปกติ แต่สามารถต้านทานเชื้อฟัลซิพารัมได้ด้วยเหตุผล cross-immunity ระหว่าง สปีชีส์ (11)

นอกจากนี้การศึกษาของ Williams และคณะ พบว่าความสามารถในการป้องกันมาลาเรียขึ้นรุนแรงและการลดปริมาณของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดผู้ที่มียีน Hb AS จะลดลงเมื่อผู้ป่วยมีความผิดปกติชนิด homozygote α^+ ร่วมด้วย แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการป้องกันมาลาเรียขึ้นรุนแรงลดลงเมื่อเกิดความผิดปกติร่วมกัน โดยการที่ยีนซึ่งอยู่คนละตำแหน่งกันมีผลไปเปลี่ยนแปลงอิทธิพลของยีนอื่นที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันเรียกว่า epistasis ในกรณี Hb AS และ α^+ -thalassemia ถือเป็น negative epistasis โดยยีน α^+ -thalassemia เป็น inhibiting gene ส่งผลให้ความสามารถของยีน Hb AS ลดลง (12)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 ประชากรและตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่มีอายุระหว่าง 18-60 ปี ทั้งเพศชายและหญิงที่มีเชื้อชาติอยู่ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ อินโดนีเซีย พม่า ไทย เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ลาว กัมพูชา ทิมอร์ตะวันออก บรูไน และสิงคโปร์ เป็นต้น ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2554 – พฤศจิกายน 2555 จำนวน 275 คน โดยวิธีดำเนินการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ COA No. 040/2013 IRB No. 459/55

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอายุ 18-60 ปี ทั้งเพศหญิงและเพศชาย
2. ผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติอยู่ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ อินโดนีเซีย พม่า ไทย เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ลาว กัมพูชา ทิมอร์ตะวันออก บรูไน และสิงคโปร์
3. ผู้ป่วยที่ให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย และยังไม่ได้รับยารักษาโรคมาลาเรียมาก่อน

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่พบภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G6PD)
2. ผู้ป่วยที่ได้รับยารักษาโรคมาลาเรียมาก่อนแล้ว
3. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสมาเดียมชนิดอื่น นอกจากชนิดพลาสโมเดียมและไวแวกซ์ หรือติดเชื้อผสม

3.1.2 ขนาดตัวอย่าง

ในการวิจัยนี้ข้อมูลที่แสดงเป็นการประมาณความชุก ดังนั้นสูตรที่ใช้ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง คือ

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 pq}{d^2}$$

โดยที่ $Z = 1.96$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$p = 0.40$ (heterozygous ธารัสซีเมียในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี
ประมาณ 35-40%)

$q = 0.60$

$d = 0.06$ ที่ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ 6%

หลังจากพิจารณาตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าโครงการวิจัยแล้ว คงเหลือผู้ป่วยมาลาเรีย
ที่ผ่านเข้าร่วมโครงการวิจัยจำนวน 199 คน ประกอบด้วยชาย 190 คน และหญิง 9 คน

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดและการเก็บข้อมูลผู้ป่วย

การเก็บตัวอย่างเลือดและข้อมูลผู้ป่วยดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาล
เวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ภายใต้การดูแลของศ. พญ.ศรวิชา คุรุทสูตร หัวหน้าหน่วย
วิจัยมาลาเรียคลินิก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัยมาลาเรีย คณะเวชศาสตร์เขตร้อน
มหาวิทยาลัยมหิดล ทั้งนี้ผู้วิจัยและเจ้าหน้าที่ได้ทำความเข้าใจที่ตรงกันทั้งในขั้นตอนของการสอบถาม
ข้อมูลอาสาสมัครและวิธีการเก็บตัวอย่าง ในการสอบถามข้อมูลได้มีพยานรับรู้เพื่อยืนยันความถูกต้อง
ของข้อมูลที่ได้รับ หลังจากนั้นให้อาสาสมัครที่ยินดีเข้าร่วมโครงการวิจัยลงลายมือชื่อยินยอมเข้าร่วม
โครงการ หรือประทับลายนิ้วมือในกรณีที่ไม่สามารถเขียนหนังสือได้ ในการวิจัยจะใช้รหัสประจำ
โครงการวิจัยเพื่อแสดงตัวอาสาสมัคร ทั้งนี้ข้อมูลส่วนบุคคลของอาสาสมัครทั้งหมดจะถูกเก็บไว้เป็น
ความลับและจะเปิดเผยเฉพาะข้อมูลที่ได้รับการวิเคราะห์แล้วเท่านั้น ทั้งนี้งานวิจัยได้รับการรับรอง
จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ COA
No. 040/2013 IRB No. 459/55

ในการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณต้นแขนของผู้ป่วยปริมาณ 6 มิลลิลิตร แบ่ง
ใส่หลอด Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 3 มิลลิลิตร เพื่อตรวจค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงและ
หลอด acid citrate dextrose (ACD) 3 มิลลิลิตร เพื่อคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และสกัด
สารพันธุกรรม (DNA) เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่ก่อให้เกิดโรคธารัสซีเมีย โดยตัวอย่างเลือด
ทั้งหมดจะถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจทางโลหิตวิทยา

การตรวจทางโลหิตวิทยาดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล โดยตรวจชนิดและปริมาณของเชื้อมาลาเรีย อุณหภูมิของร่างกาย และพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ถูกใช้ในงานวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา

พารามิเตอร์	ค่าปกติ	การแปลผล
MCV (fl)	82 – 96	MCV < 80 fl : อาจเป็น Alpha thalassemia
MCH (pg)	26 – 32	MCH < 27 pg : อาจเป็น Alpha thalassemia
Temperature (°C)	36.5 - 37.5	Hyperpyrexia : Core body temperature > 40 ° C
Hemoglobin (g/dl)	14 – 18	Severe anemia : Hemoglobin <7g/dl
Total bilirubin (mg/dl)	0.0 – 1.0	Hyperbilirubinemia : Total bilirubin > 2.5 mg/dl
Glucose (mg/dl)	75 – 115	Hypoglycemia : Whole blood glucose < 40 mg/dl
Creatinine (mg/dl)	0.7 – 1.2	Renal failure : Seruncreatinine > 3.0 mg/dl
Parasite (no./µl)	-	Hyperparasitemia : parasitemia >100,000 / µl

3.4 การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เชิงปริมาณวิเคราะห์

ใช้ตัวอย่างเลือดจากหลอด ACD 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกชั้น plasma และ buffy coat ออกจาก packed red cell ที่ความเร็ว 3000 rpm 5 นาที จากนั้นปั่นล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลือ (Normal saline 0.9%) จำนวน 3 รอบ ในรอบสุดท้ายให้เหลือน้ำเกลือไว้ประมาณ 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดง เพื่อนำไปวัดค่าฮีโมโกลบิน (Hb) ด้วยเครื่อง HemoCue Hemoglobin Photometer สำหรับการคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD (G 6-PD activity) โดยไมโครคิวเวตที่เคลือบด้วย sodium deoxycholate เพื่อทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และปล่อยฮีโมโกลบินออกมา แล้ว sodium nitrite จะเปลี่ยนรูปเหล็กในฮีโมโกลบินจาก เฟอร์รัส (ferrous) ไปเป็น เฟอร์ริก (ferric) เพื่อสร้างเป็น methemoglobin ซึ่งจะจับกับ azide ได้เป็น azide methemoglobin จากนั้นเครื่องจะตรวจการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และที่ 880 นาโนเมตรเพื่อชดเชยค่าความขุ่นซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน

จากนั้นใส่น้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร ลงในเม็ดเลือดแดงปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นนำมาตั้งให้ละลายที่

อุณหภูมิห้องและเขย่าอีกครั้ง นำไปปั่นที่ 14,000 rpm 10 นาที นำส่วนบน (hemolysate) มาตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD โดยอาศัยการดูดกลืนแสงของ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยใช้วิธีของ Betk K และคณะ (1967) โดยนำ hemolysate 50 ไมโครลิตร มาบ่มกับ Stock solution (2 mM NADP, 1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M MgCl₂) 850 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม G 6-P (6 mM glucose 6-phosphate) 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยต่อนาทีมาคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD โดยใช้สูตร

$$\text{G 6-PD activity (IU/g Hb)} = \frac{1 \times \text{OD/ min} \times \text{dilution} \times 100 \times \text{TCF}}{6.22 \times 0.05 \times \text{Hb (g/dL)}}$$

- โดยที่ 1 = ปริมาตรของเหลวในหลอดทดลองที่ทำปฏิกิริยา(ml)
 6.22 = ค่าการดูดกลืนแสงของ NADPH 1 mM ที่ความยาวแสง 340 mm ในทางเดินแสง 1 cm. (Millimolar absorptivity of reduced NADP)
 Dilution = 50 µl : 950 µl = 20
 100 = factor เพื่อรายงานเป็นหน่วย IU/g Hb
 0.05 = จำนวน hemolysate ที่ใช้ (ml)
 Hb (g/dl) = ค่า Hb ที่วัดได้
 TCF = Temperature correction factor

การแปลผล

Deficiency:	G 6-PD activity	≤ 1.40	IU/g Hb
Normal:	G 6-PD activity	> 1.40	IU/g Hb

3.5 การสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บใส่หลอด ACD มาสกัดสารพันธุกรรมโดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม โดยนำตัวอย่างเลือดมาล้างเพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดงด้วย lysis buffer (0.32 M sucrose (USB), 10 mM Tris-HCl pH 7.5 (Fisher Scientific, J.T. BAKER), 5 mM MgCl₂ (BIO BASIC INC), 1%

triton X-100 (SIGMA)) โดยแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการปั่นล้างซ้ำจนได้ตะกอนเม็ดเลือดขาวที่สะอาด จากนั้นใส่ SE buffer (0.75 M NaCl (UNIVAR), 0.024 M EDTA pH 8.0 (Plusone[®] Amersham Biosciences)) Proteinase K buffer (27% sucrose (USB), 1X SSC, 1 mM EDTA (Plusone[®] Amersham Biosciences), 1% SDS (GE Healthcare)) และ Proteinase K (Amresco) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อแตกเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นแยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีนและไขมันด้วย Phenol:Chloroform:isopropanal อัตราส่วน 25:24:1 เขย่าไปมาเป็นเวลา 30 – 120 นาที แล้วปั่นด้วยความเร็ว 2,500 RPM 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanal (MERCK) กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วปั่นด้วยความเร็ว 4,000 RPM 10 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอมาล้างด้วย 70% Ethanol แล้วปั่นด้วยความเร็ว 4,000 RPM 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนบนออกแล้วเปิดฝากระเหย ethanol ให้หมด แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE-4 buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) โดยใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นให้เป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับใช้ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาและเบต้าโกลบินต่อไป

3.6 การคัดกรองผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ตรวจคัดกรองผู้ป่วยธาลัสซีเมียด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง โดยอาศัยค่า MCV และ MCH (1) กล่าวคือ ถ้าค่า MCV < 80 fL และ MCH < 27 pg จะสามารถเป็น α -thalassemia โดยอาจเป็นได้ทั้ง Thal 1 หรือ Thal 2 หรือ β -thalassemia หรือ Hb E แต่ถ้า MCV > 80 fL หรือ MCH > 27 pg จะไม่เป็นโรคธาลัสซีเมีย หรืออาจเป็นโรคแต่เป็นชนิดที่ไม่รุนแรง เช่น α -thalassemia 2, Hb CS, หรืออาจมี Hb E

3.7 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาและเบต้าโกลบิน

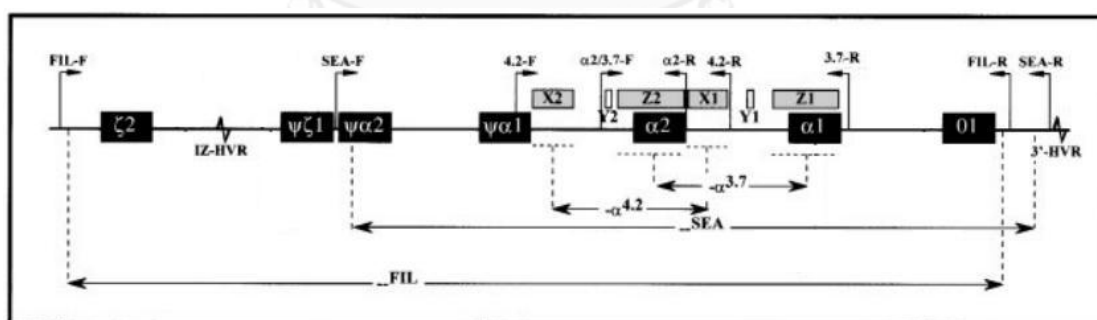
3.7.1 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินด้วยเทคนิค Multiplex Gap-polymerase chain reaction (Multiplex Gap-PCR)

นำสารพันธุกรรมที่สกัดด้วยวิธีฟินอล-คลอโรฟอร์มมาศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยวิธี multiplex Gap-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีการออกแบบไว้แล้วจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (35) ซึ่งใช้

primer หลายเส้นในหลอดเดียว (single-tube multiplex-PCR) เพื่อตรวจหาฮีนที่ปกติ ($\alpha\alpha$) และฮีนที่ผิดปกติ ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $-\text{SEA}$, $-\text{FIL}$) ไปพร้อมๆ กัน โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีลำดับเบสและตำแหน่ง ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 12 (35)

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ของฮีนแอลฟาโกลบิน

Name	5' → 3' Sequence	ชนิดการกลายพันธุ์	ขนาด PCR product (bp)
LIS1-F	GTCGTCAGTGGCAGCGTAGATC	positive control	2503
LIS1-R	GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG	positive control	
$\alpha 2/3.7$ -F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	$\alpha\alpha$, $-\alpha^{3.7}$	1800, 2022
3.7-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	$-\alpha^{3.7}$	2022
$\alpha 2$ -R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	$\alpha\alpha$	1800
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	$-\alpha^{4.2}$	1628
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTC	$-\alpha^{4.2}$	
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	$-\text{SEA}$	1349
SEA-R	AGCCACGTTGTGTTTCATGGC	$-\text{SEA}$	
FIL-F	TGCAAATATGTTTCTCTCATTCTGTG	$-\text{FIL}$	1166
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	$-\text{FIL}$	



ภาพที่ 12 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ของฮีนแอลฟาโกลบิน

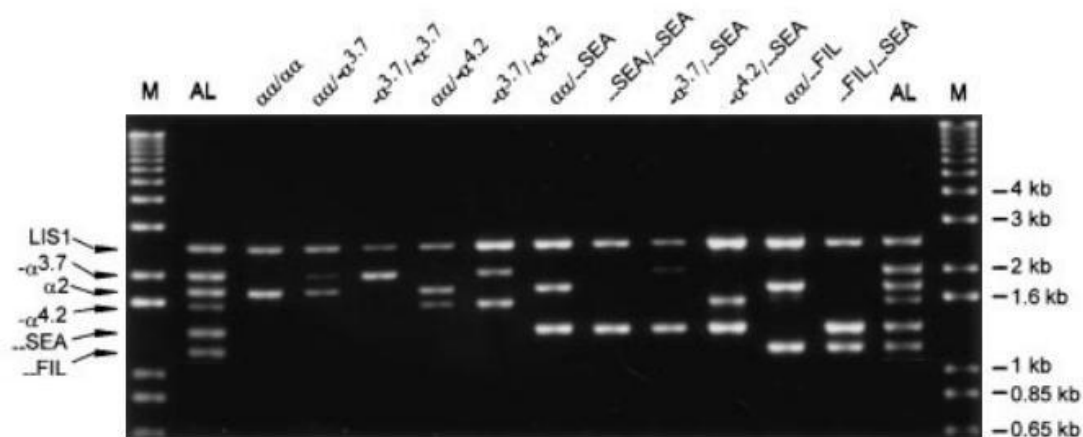
Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารใน Master mix ดังนี้ 1X PCR buffer, 1.25 U Platinum Taq DNA polymeras (Invitrogen), 200 μ M dNTPs (Invitrogen), 1.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 0.2 μ M primer (Bio Basic Inc.), 1 M Betaine (sigma), 100 ng DNA template โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ

Pre denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5.00	นาที	} 30 รอบ
Denaturation	อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส	0.45	นาที	
Annealing	อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส	1.15	นาที	
Extention	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	2.30	นาที	
Post Extention	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	5.00	นาที	

Gel electrophoresis

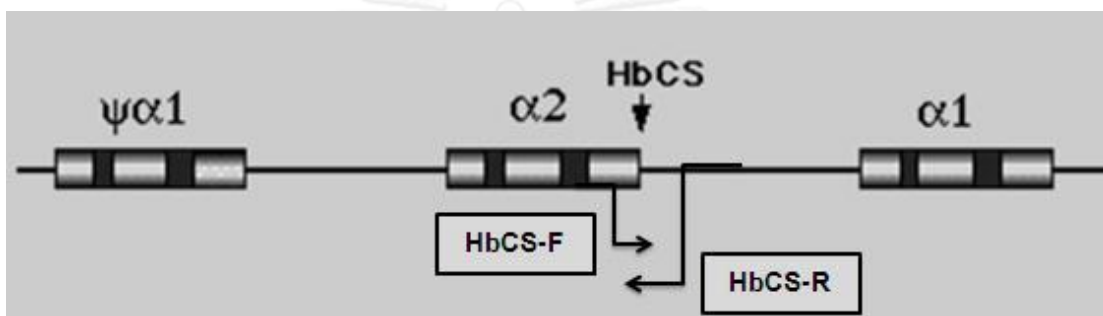
นำ PCR product 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol) 1 ไมโครลิตร โหลดตัวอย่างลงเจล(1% agarose gel (Amresco)) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 75 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (Promaga) 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel DocTM โดยใช้โปรแกรม Image LabTM ตัวอย่างผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาไกลบิน และขนาด PCR product ดังแสดงในภาพที่ 13 (35)



ภาพที่ 13 ตัวอย่างผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาไกลบิน และขนาด PCR product

3.7.2 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง

ตรวจการกลายพันธุ์ชนิด HbCS ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้ HbCS-F (5'- TCGGGCCTGGGCCGCACTGA -3') และ HbCS-R (5'- GCCGCCACTCAGACTTTATT -3') (36) ดังแสดงในภาพที่ 14 แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Tru1I* (*MseI*) เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยผู้ที่มีการกลายพันธุ์แบบ HbCS ($\alpha\alpha^{CS}$) จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Tru1I* ส่วนคนปกติ ($\alpha\alpha$) จะมีตำแหน่งที่เอนไซม์สามารถตัดได้ดังแสดงในภาพที่ 15 (36)



ภาพที่ 14 ตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจการหาการกลายพันธุ์ชนิด HbCS

Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารใน Master mix ดังนี้ 1X PCR buffer, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 200 μ M dNTPs (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 μ M primer (Bio Basic Inc.), 50 ng DNA template โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ

Pre denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5.00	นาที	} 30 รอบ
Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
Annealing	อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
Extention	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
Post extention	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10.00	นาที	

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

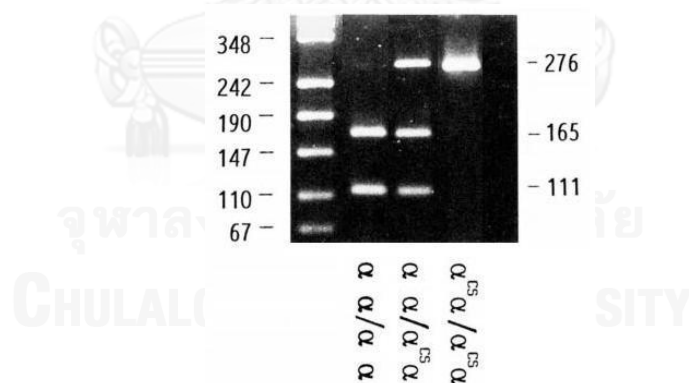
นำ PCR product 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Master mix (1 U restriction enzyme (*Tru1I*) (Fermentas), 1X Buffer R) 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง โดยตำแหน่งที่เอนไซม์ *Tru1I* ตัดคือ 5'...T[↓]AT A A...3'

Gel electrophoresis

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำ RFLP 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading buffer (RBC Bioscience) 1 ไมโครลิตร โหลดตัวอย่างลงเจล (2.5% agarose gel (Amresco)) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (Promaga) 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel DocTM โดยใช้โปรแกรม Image LabTM

PCR product ที่ได้มีขนาด 276 bp เมื่อผ่านการทำ RFLP ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดดังนี้ (ภาพที่ 15)

1. ผู้ที่มีการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงจะไม่มีตำแหน่งที่เอนไซม์ *Tru1I* สามารถตัดได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะยังคงมีขนาด 276 bp
2. ผู้ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงจะมีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Tru1I* จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 165 bp และ 111 bp

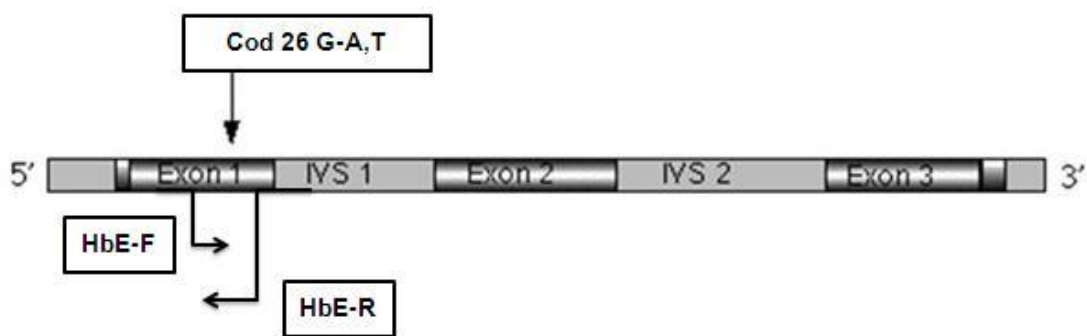


ภาพที่ 15 ตัวอย่างผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด Hb CS และขนาด PCR product

3.7.3 การตรวจการกลายพันธุ์ชนิด HbE codon 26 (G → A)

ตรวจการกลายพันธุ์ชนิด HbE ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้แล้วในการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยมีลำดับเบสดังนี้ HbE-F (5'-CATTTGCTTCTGACACAAGT-3') และ

HbE-R (5'-TTGAGGTTGCCAGGTGAG-3') (37) ดังแสดงในภาพที่ 16 แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MnII* เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ โดยผู้ที่มีการกลายพันธุ์แบบ HbE (β^E) จะมีตำแหน่งที่เอนไซม์ *MnII* ตัดได้สองตำแหน่งเดียวเมื่อเทียบกับคนปกติ (β^A) ที่เอนไซม์สามารถตัดได้สามตำแหน่ง (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 16 ตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจการหาการกลายพันธุ์ชนิด HbE

Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารใน Master mix ดังนี้ 1X PCR buffer, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 200 μ M dNTPs (Invitrogen), 1.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 0.2 μ M primer (Bio Basic Inc.), 50 ng DNA template โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ

Pre denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5.00	นาที	} 30 รอบ
Denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
Annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
Extention	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
Post extention	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10.00	นาที	

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

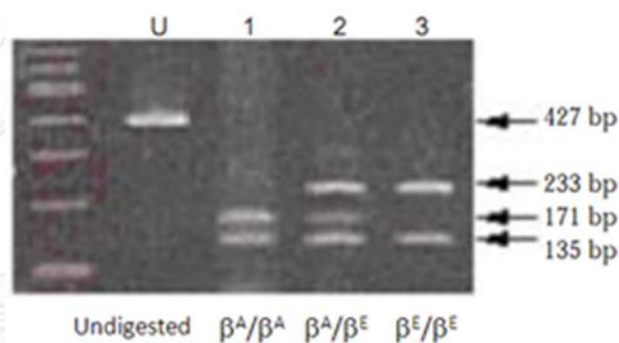
นำ PCR product 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Master mix (1 U restriction enzyme (*MnII*) (Fermemtas), 1X Buffer R) 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง โดยตำแหน่งที่เอนไซม์ *MnII* ตัดคือ 5'...C C T C (N)₇^...3'

Gel electrophoresis

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำ RFLP 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading buffer (RBC Bioscience) 1 ไมโครลิตร โหลดตัวอย่างลงเจล (2.5% agarose gel (Amresco)) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (Promaga) 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Doc™ โดยใช้โปรแกรม Image Lab™

PCR product ที่ได้มีขนาด 427 bp เมื่อผ่านการทำ RFLP ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดดังนี้ (ภาพที่ 17)

1. ผู้ที่มีการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินอีจะมีตำแหน่งที่เอนไซม์ *MnII* สามารถตัดได้ 2 ที่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 233 bp 59 bp และ 135 bp
2. ผู้ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินอีจะมีตำแหน่งที่เอนไซม์ *MnII* สามารถตัดได้ 3 ที่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 233 bp 59 bp 171 bp และ 135 bp



ภาพที่ 17 แสดงตำแหน่งและผลที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *MnII*

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.8.1 วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย เช่น เพศ อายุ เชื้อชาติ เป็นต้น โดยแสดงผลเป็นร้อยละสำหรับข้อมูลเชิงคุณภาพ ส่วนข้อมูลเชิงปริมาณแสดงผลเป็น mean (\pm S.D.)

3.8.2 วิเคราะห์ข้อมูลการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมาลาเรีย

1. วิเคราะห์ความถูกต้องของข้อมูลจีโนไทป์ตามทฤษฎีสาร์ดี – ไวเบิร์ก (Hardy-Weinberg theory)

$$(pA+qa)^2 = p^2AA+2pqAa+q^2aa = 1$$

เมื่อ A, a คือ อัลลีล

p	คือ ความถี่ของอัลลีลA
q	คือ ความถี่ของอัลลีลa
p ²	คือ ความถี่ของจีโนไทป์ AA
q ²	คือ ความถี่ของจีโนไทป์ aa
2pq	คือ ความถี่ของจีโนไทป์ Aa

2. วิเคราะห์ความถี่ของอัลลีลของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมาลาเรีย โดยใช้ genecounting

3.8.3 คำนวณความชุกของโรคราลัสซีเมียแต่ละชนิดในผู้ป่วยมาลาเรีย

$$\text{ความชุกของธาลัสซีเมีย} = \frac{a}{a+b}$$

เมื่อ a คือ จำนวนประชากรที่เป็นธาลัสซีเมีย

b คือ จำนวนประชากรที่ไม่เป็นธาลัสซีเมีย

3.8.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างธาลัสซีเมียกับอาการต่างๆ ทางคลินิกของมาลาเรีย

1. การวิเคราะห์ค่าตัวแปรเชิงปริมาณในโดยใช้ Student t-test และ One-Way Anova test (เปรียบเทียบความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

2. การวิเคราะห์ค่าตัวแปรเชิงคุณภาพโดยใช้ Pearson's χ^2 test และ Fisher's exact test (เปรียบเทียบความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของมาลาเรียขั้นรุนแรง (severe malaria) ในกลุ่มที่พบและกลุ่มที่ไม่การกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียโดยใช้ Relative risk (RR)

บทที่ 4

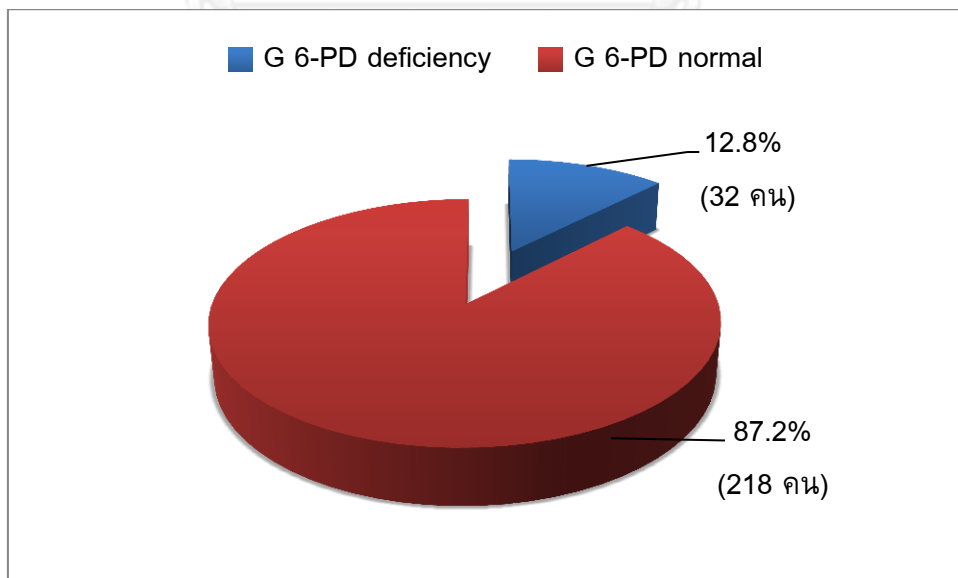
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 กลุ่มประชากรที่ศึกษา

จากการเก็บข้อมูลผู้ป่วยมาลาเรียที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่วันที่ 28 มีนาคม พ.ศ. 2554 จนถึงวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 มีผู้ป่วยทั้งหมด 275 คน จากการคัดกรองในเบื้องต้นมีผู้ป่วยที่ถูกคัดออกจากการวิจัยจำนวน 25 คน ได้แก่ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียหลายชนิดร่วมกัน จำนวน 5 คน ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยจำนวนที่น้อย นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยที่มีข้อมูลไม่ครบถ้วนจำนวน 20 คน จึงคงเหลือผู้ป่วยจำนวน 250 คน เพื่อศึกษาในลำดับต่อไป

4.2 การคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

จากการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยการตรวจวัดปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ในผู้ป่วยทั้งหมด 250 คน พบผู้ป่วยมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (≤ 1.4 IU/g Hb) จำนวน 32 คน คิดเป็นร้อยละ 12.8 ผู้ป่วยกลุ่มนี้จึงถูกคัดออกจากการวิจัย จึงคงเหลือผู้ป่วยจำนวน 218 คน เพื่อศึกษาในลำดับต่อไป (ภาพที่ 18)

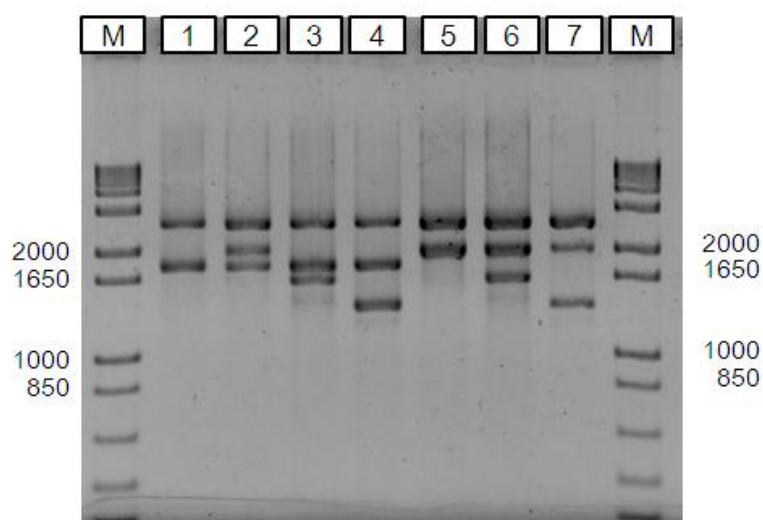


ภาพที่ 18 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในผู้ป่วยมาลาเรียที่ศึกษา

4.3 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาและเบต้าโกลบิน

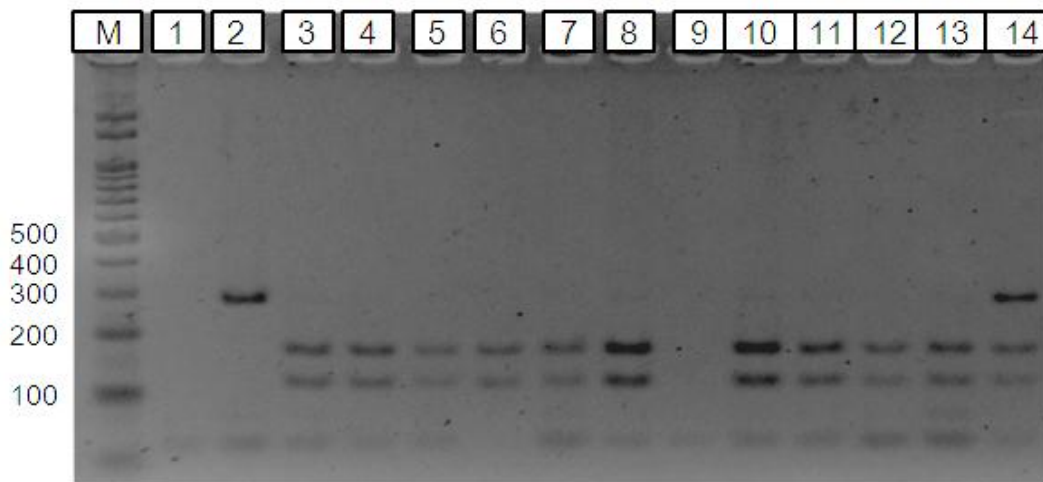
4.3.1 การกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินชนิด $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$ และ $--^{FIL}$ ด้วยวิธี multiplex gap-PCR และ HbCS ด้วยวิธี PCR-RFLP ในผู้ป่วยมาลาเรีย 218 คน พบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินทั้งหมด 102 คน แบ่งเป็น $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ จำนวน 76 คน (ร้อยละ 34.9 ของผู้ป่วยมาลาเรียทั้งหมด) ชนิด $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ จำนวน 17 คน (ร้อยละ 7.8) ชนิด $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$ จำนวน 3 คน (ร้อยละ 1.4) ชนิด $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ จำนวน 2 คน (ร้อยละ 0.9) ชนิด $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ชนิด $--^{SEA}/\alpha\alpha$ ชนิด $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ และชนิด $-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}$ ชนิดละ 1 คน (ร้อยละ 0.5) และไม่พบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ชนิด $--^{FIL}$ ดังแสดงในภาพที่ 19 และ 20 โดยมีความถี่ของอัลลีล $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$ และ α^{CS} เท่ากับ 0.274, 0.008, 0.005 และ 0.010 ตามลำดับ ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ต่างๆ ในผู้ที่พบการกลายพันธุ์แสดงในภาพที่ 21



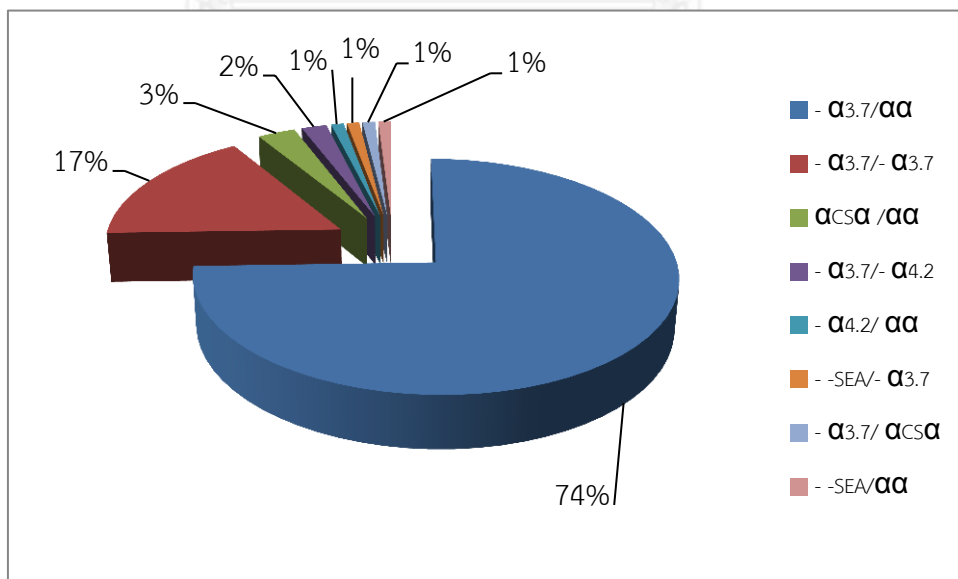
ภาพที่ 19 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน

ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิด $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$ และ $--^{FIL}$ Lane M คือ 1 Kb DNA Ladder, Lane 1 คือ ยีนแอลฟาโกลบินปกติ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) Lane 2 คือ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ Lane 3 คือ $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ Lane 4 คือ $--^{SEA}/\alpha\alpha$ Lane 5 คือ $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ Lane 6 คือ $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ และ Lane 7 คือ $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$



ภาพที่ 20 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (HbCS)

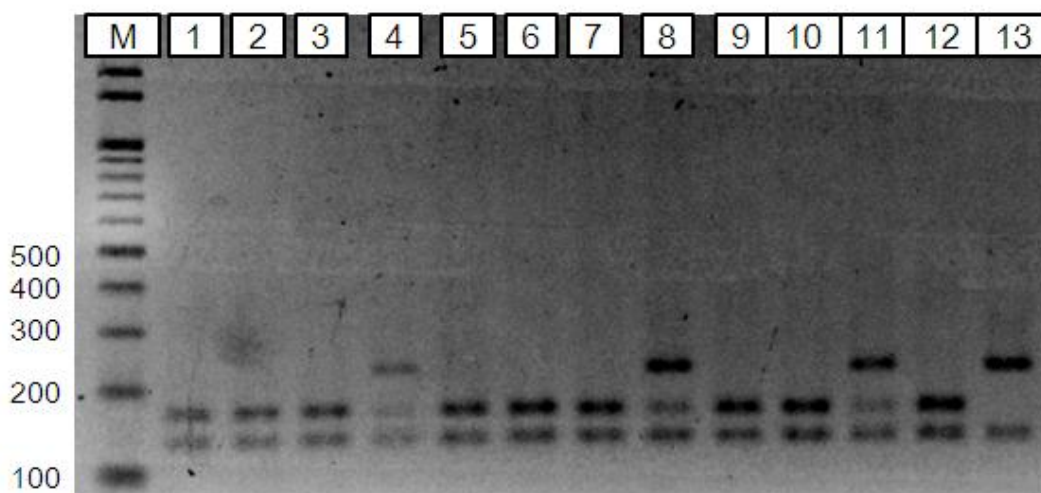
ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (HbCS) โดยที่ Lane M คือ 100 bp DNA Ladder, Lane 2 คือ Homozygous HbCS ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$) Lane 3-8, 10-13 คือ ผู้ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิด HbCS และ Lane 14 คือ Heterozygous HbCS ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$)



ภาพที่ 21 ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์แบบต่างๆ ในผู้ป่วยมาลาเรียที่พบการกลายพันธุ์

4.3.2 การกลายพันธุ์ชนิดHbE codon 26 (G → A)

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินชนิดฮีโมโกลบินอี (HbE) ในผู้ป่วยมาลาเรีย 218 คน พบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ทั้งหมด 39 คน ประกอบด้วย Heterozygous HbE ($\beta^E\beta^A$) จำนวน 33 คน (ร้อยละ 15.1) และ Homozygous HbE ($\beta^E\beta^E$) จำนวน 6 คน (ร้อยละ 2.8) โดยมีความถี่ของอัลลีล β^E เท่ากับ 0.113 ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินอี (HbE)

ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดฮีโมโกลบินอี (HbE) โดยที่ Lane M คือ 100 bp DNA Ladder, Lane 1-3, 5-7, 9, 10, 12 คือ ผู้ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิด HbE Lane 4, 8, 11 คือ Heterozygous HbE ($\beta^E\beta^A$) และ Lane 13 คือ Homozygous HbE ($\beta^E\beta^E$)

4.4 ผลการคัดกรองผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

จากการตรวจคัดกรองผู้ป่วยธาลัสซีเมียด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (MCV) ผู้ป่วยที่มีโอกาสเป็น α -thalassemia ชนิด Thal 1, Thal 2, β -thalassemia หรือ Hb E จะมีค่า MCV < 80 fL แต่หากพบค่า MCV > 80 fL ผู้ป่วยอาจเป็นธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่รุนแรง เช่น α -thalassemia 2, Hb CS, หรือ Hb E หรืออาจไม่พบธาลัสซีเมีย จากผลการคัดกรองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการคัดกรองธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรียโดยใช้ค่า MCV

Genotype	MCV < 80	MCV > 80	Total	%
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	19	84	103	47.2
-- ^{SEA} /- $\alpha^{3.7}, \beta^E\beta^A$	1	0	1	0.5
- $\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha, \beta^E\beta^A$	1	0	1	0.5
-- ^{SEA} / $\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	1	0	1	0.5
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^A\beta^A$	13	1	14	6.4
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}, \beta^A\beta^A$	2	0	2	0.9
- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	25	31	56	25.7
$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	3	0	3	1.4
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$	10	3	13	6.0
- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$	9	4	13+1*	6.4
- $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$	0	1	1	0.5
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^E\beta^A$	3	0	3	1.4
- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^E$	6	0	6	2.8
Total	93	124	218	100.0

* ผู้ป่วยที่ไม่ทราบค่า MCV แต่พบการกลายพันธุ์แบบ - $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$

จากการคัดกรองธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรียด้วยการประเมินค่า MCV พบผู้ป่วยที่มีค่า MCV<80 fl แต่ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ - $\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{4.2}$, --^{SEA}, HbCS หรือ HbE จำนวน 19 คน อาจเป็นเพราะผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็น iron deficiency หรือน่าจะมีการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาหรือเบต้า โกลบินชนิดอื่นๆ ที่ผู้วิจัยไม่สามารถตรวจพบได้จากการศึกษาครั้งนี้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงคัดแยกผู้ป่วยกลุ่มนี้ออกจากการวิเคราะห์ในลำดับต่อไป เนื่องด้วยอาจส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์ที่ผิดพลาดได้ โดยผู้วิจัยกำหนดให้ผู้ป่วยมาลาเรียกลุ่มที่ไม่พบการกลายพันธุ์และมีค่า MCV>80 fl เป็นตัวแทนของกลุ่ม Control ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนที่ก่อให้เกิดธาลัสซีเมีย และไม่พบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

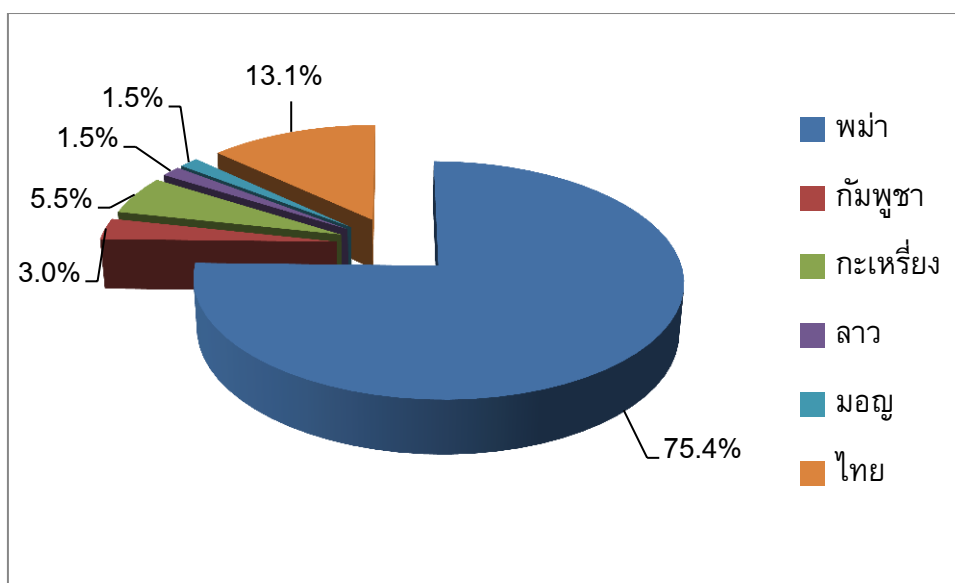
4.5 ข้อมูลของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

จากผู้ป่วยมาลาเรียทั้งหมด 275 คน เมื่อคัดกรองผู้ป่วยตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย เข้าร่วมในการวิจัย พบว่ามีผู้ป่วยที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกจำนวน 199 คน แบ่งเป็นเพศชาย 190 คน (ร้อยละ 95.5) และหญิง 9 คน (ร้อยละ 4.5) แบ่งเป็นเชื้อชาติ พม่า 150 คน (ร้อยละ 75.4) ไทย 26 คน (ร้อยละ 13.1) กะเหรี่ยง 11 คน (ร้อยละ 5.5) กัมพูชา 6 คน (ร้อยละ 3.0) ลาวและมอญชาติละ 3 คน (ร้อยละ 1.5) (ภาพที่ 23) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าผู้ป่วยบางเชื้อชาติมีจำนวนที่น้อย ผู้วิจัย จึงจัดกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียใหม่ตามความคล้ายคลึงกันของเชื้อชาติได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติพม่า กะเหรี่ยง และมอญ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติ ไทย ลาว และกัมพูชา ข้อมูลของอายุและชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามเพศและกลุ่มเชื้อชาติแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ข้อมูลของผู้ป่วยมาลาเรีย

ข้อมูลของผู้ป่วยมาลาเรีย	จำนวน N (%)	อายุ mean \pm SD	เชื้อที่ได้รับ N (%)	
			ฟัลซิพารัม	ไวแวกซ์
เพศ				
ชาย	190 (95.5)	27.6 \pm 9.7	81 (42.6)	109 (57.4)
หญิง	9 (4.5)	37.4 \pm 13.3	3 (33.3)	6 (66.7)
รวม	199 (100.0)	28.0 \pm 10.0	84 (42.2)	115 (57.8)
เชื้อชาติ				
พม่า				
กะเหรี่ยง	164 (82.4)	27.4 \pm 9.8	72 (43.9)	92 (56.1)
มอญ				
ไทย				
ลาว	35 (17.6)	30.6 \pm 10.6	12 (34.3)	23 (65.7)
กัมพูชา				
รวม	199 (100.0)	28.0 \pm 10.0	84 (42.2)	115 (57.8)

อายุเฉลี่ยของกลุ่มประชากรที่ศึกษาคือ 28 ปี โดยผู้ป่วยเพศหญิงมีอายุเฉลี่ยสูงกว่าเพศชาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t -test, $p = 0.006$) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มเชื้อชาติไม่มีความแตกต่างกัน (t -test, $p > 0.05$) โดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในกลุ่มที่ศึกษาติดเชื้อชนิดไวแวกซ์ (ร้อยละ 57.8) แต่ทั้งนี้ชนิดของเชื้อที่ได้รับไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ เพศ และเชื้อชาติ (χ^2 test, $p > 0.05$) กล่าวคือผู้ป่วยทั้งเพศชายและหญิง ทุกช่วงอายุ และทุกเชื้อชาติ สามารถติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซ์ได้ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 23 ข้อมูลของผู้ป่วยมาลาเรียแยกตามเชื้อชาติ

4.6 การวิเคราะห์ความถูกต้องของข้อมูลจีโนไทป์ตามทฤษฎีฮาร์ดี - ไวเบอร์ก

จากการคำนวณค่าความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของการกลายพันธุ์ชนิด $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, α^{SEA} , HbCS และ HbE และทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความถี่จีโนไทป์ที่พบและที่คาดหวังตามทฤษฎีของฮาร์ดี-ไวเบอร์ก (Hardy-Weinberg theory) โดยใช้ χ^2 test (ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 99) ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของการกลายพันธุ์ $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, α^{SEA} , HbCS และ HbE

Thalassemia	Genotype Frequency			Allele Frequency (a)	HWE p-value
	AA	Aa	aa		
$\alpha^{3.7}$	107	75	17	0.274	0.761
$\alpha^{4.2}$	196	3	0	0.008	0.994
α^{SEA}	197	2	0	0.005	0.998
α^{FIL}	199	0	0	0.000	-
β^E	160	33	6	0.113	0.051
α^{CS}	195	4	0	0.010	0.990

A = Normal, a = Mutation

4.7 ความชุกของธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรีย

จากการศึกษาความชุกของธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรียพบจีโนไทป์แบบต่างๆ จำนวน 115 คน (ร้อยละ 57.8) แบ่งเป็น $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$ จำนวน 56 คน (ร้อยละ 28.1) $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^A$ และ $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$, $\beta^A\beta^A$ ชนิดละ 14 คน (ร้อยละ 7.0) $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^A$ จำนวน 13 คน (ร้อยละ 6.5) $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^E$ จำนวน 6 คน (ร้อยละ 3.0) $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$, $\beta^E\beta^A$ และ $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$ ชนิดละ 3 คน (ร้อยละ 1.5) $\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$, $\beta^A\beta^A$ จำนวน 2 คน (ร้อยละ 1.0) และ $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^A$ และ $\alpha^{SEA}/\alpha^{3.7}$, $\beta^E\beta^A$ และ $\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$, $\beta^E\beta^A$ และ $\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$ ชนิดละ 1 คน (ร้อยละ 0.5) โดยสามารถจัดกลุ่มชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียตามลักษณะอาการของธาลัสซีเมียได้เป็น 6 กลุ่ม (ตารางที่ 7) ได้แก่

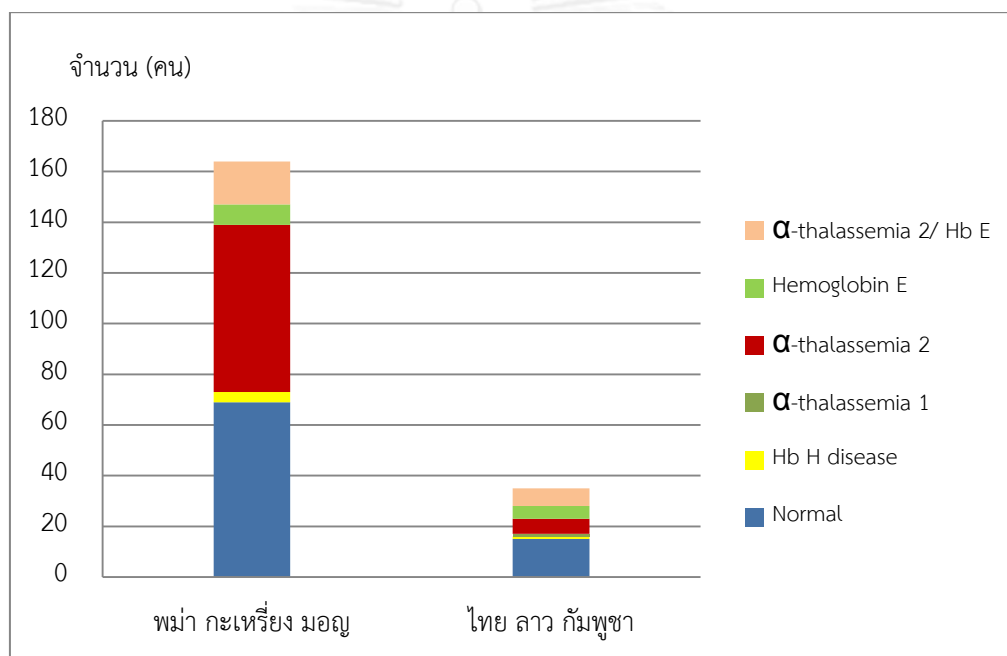
1. Hb H disease ได้แก่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ $\alpha^{SEA}/\alpha^{3.7}$, $\beta^E\beta^A$ แบบ $\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$, $\beta^E\beta^A$ และแบบ $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$
2. α -thalassemia 1 ได้แก่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ $\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$
3. α -thalassemia 2 ได้แก่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$, $\beta^A\beta^A$ แบบ $\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$, $\beta^A\beta^A$ และแบบ $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$
4. Hemoglobin E ได้แก่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^A$
5. α -thalassemia 2 / Hb E ได้แก่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^A$ แบบ $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^A$ แบบ $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$, $\beta^E\beta^A$ และแบบ $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $\beta^E\beta^E$
6. Normal คือผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ ที่มีจีโนไทป์แบบ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\beta^A\beta^A$

ตารางที่ 7 ผู้ป่วยมาลาเรียแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย

Thalassemia	N (%)
Hb H disease	5 (2.5)
α -thalassemia 1	1 (0.5)
α -thalassemia 2	72 (36.2)
Hemoglobin E	13 (6.5)
α -thalassemia 2/ Hb E	24 (12.1)
Normal	84 (42.2)
Total	199 (100)

4.7.1 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามเชื้อชาติของผู้ป่วยมาลาเรีย

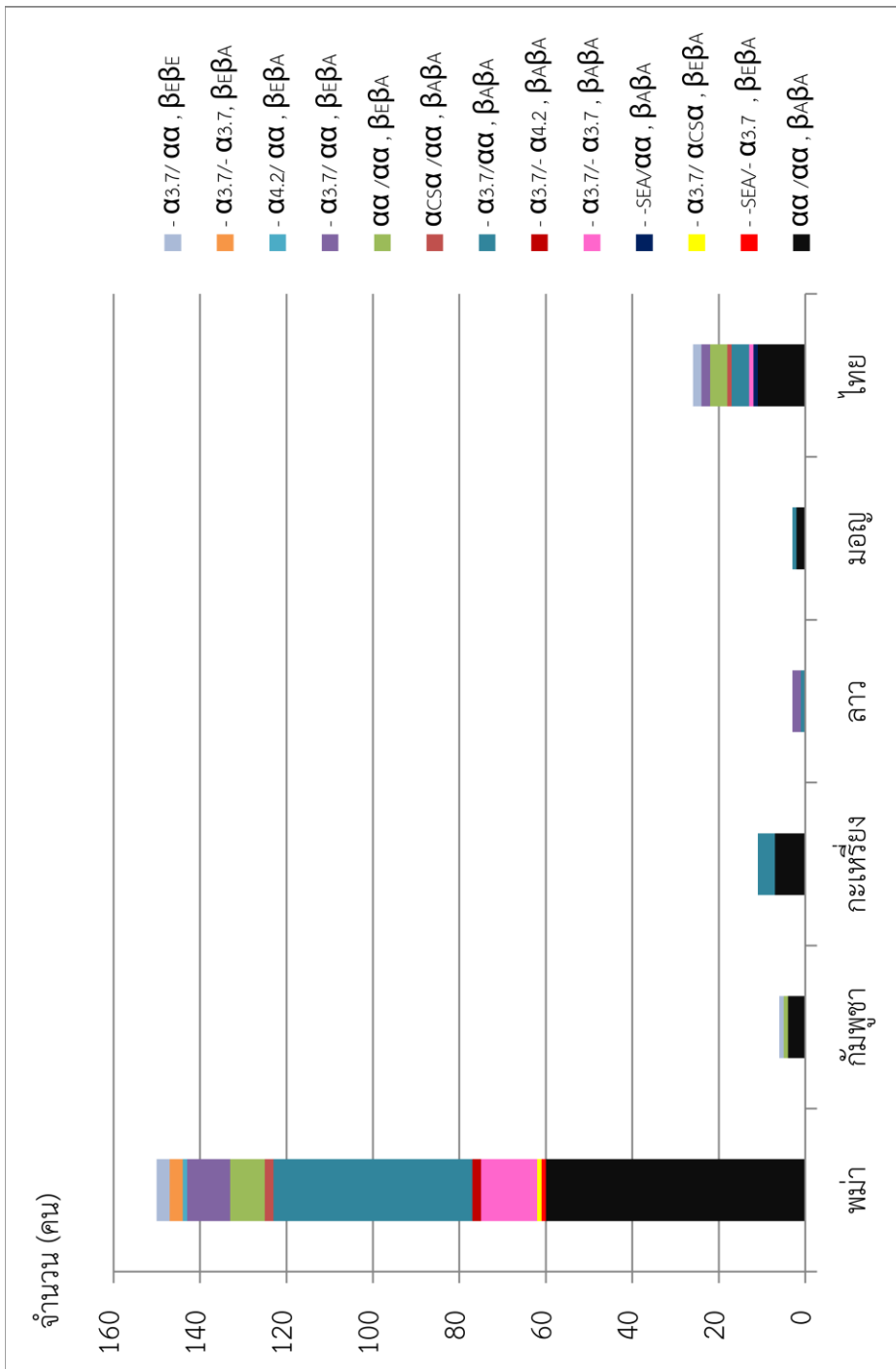
จากการศึกษาความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามลักษณะอาการของธาลัสซีเมียในผู้ป่วยมาลาเรีย ไม่พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มเชื้อชาติ (Fisher's exact test, $p > 0.05$) (ภาพที่ 24) และผลการศึกษาในการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมีย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของการกลายพันธุ์กับเชื้อชาติของผู้ป่วยเช่นกัน โดยผู้ป่วยทุกเชื้อชาติสามารถพบการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียได้ไม่แตกต่างกัน (Fisher's exact test, $p > 0.05$) (ตารางที่ 8 และภาพที่ 25) แต่เมื่อพิจารณาจะพบว่า $\alpha^{3.7}$ และ β^E พบมากในชาวพม่า และไทย



ภาพที่ 24 ลักษณะของธาลัสซีเมียในแต่ละกลุ่มเชื้อชาติ

ตารางที่ 8 ความชุกของรหัสจีโนมแยกตามเชื้อชาติของผู้ป่วยมาลาเรีย

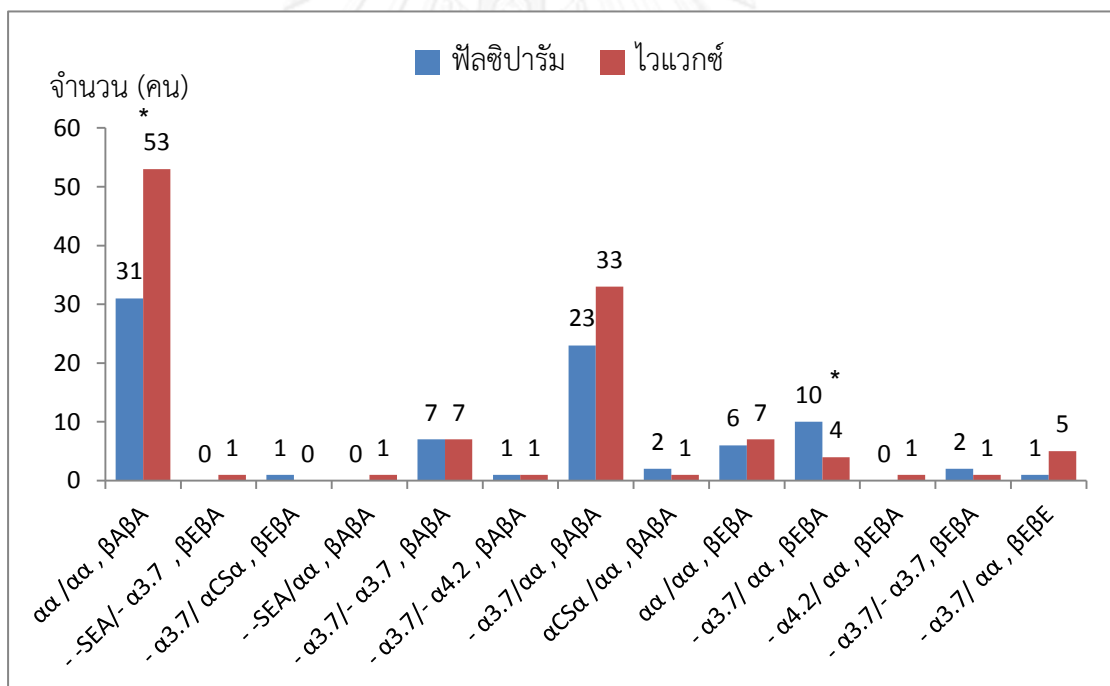
Genotype	เชื้อชาติ						รวม
	พม่า	กัมพูชา	กะเหรี่ยง	ลาว	มอญ	ไทย	
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	60 (40.0)	4	7	0	2	11 (42.3)	84 (42.2)
$-\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7}, \beta^{EA}\beta^A$	1 (0.7)	0	0	0	0	0	1 (0.5)
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}, \beta^{EA}\beta^A$	1 (0.7)	0	0	0	0	0	1 (0.5)
$-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	0	0	0	0	0	1 (3.8)	1 (0.5)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^A\beta^A$	13 (8.7)	0	0	0	0	1 (3.8)	14 (7.0)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}, \beta^A\beta^A$	2 (1.3)	0	0	0	0	0	2 (1.0)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	46 (30.7)	0	4	1	1	4 (15.4)	56 (28.1)
$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	2 (1.3)	0	0	0	0	1 (3.8)	3 (1.5)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$	8 (5.3)	1	0	0	0	4 (15.4)	13 (6.5)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$	10 (6.7)	0	0	2	0	2 (7.7)	14 (7.0)
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^A$	1 (0.7)	0	0	0	0	0	1 (0.5)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^E\beta^A$	3 (2.7)	0	0	0	0	0	3 (1.5)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^E$	3 (2.0)	1	0	0	0	2 (7.7)	6 (3.0)
รวม	150	6	11	3	3	26	



ภาพที่ 25 ความสุขของชาวลี้ซึเมียในแต่ละเชื้อชาติ

4.7.2 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับ

ผู้ป่วยมาลาเรียส่วนใหญ่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์มากกว่าฟลซิปารัม (57.8 : 42.2) โดยเมื่อพิจารณาแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ (ภาพที่ 26) และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของการกลายพันธุ์กับชนิดของเชื้อที่ได้รับเทียบกับกลุ่ม control พบว่าผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แบบ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อชนิดฟลซิปารัมมากกว่าไวแวกซ์เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ประมาณ 2 เท่า (RR=1.935, 95% CI = 1.255-2.986; $p= 0.020$) (ตารางที่ 9) แต่เมื่อแยกวิเคราะห์ผู้ป่วยตามเชื้อชาติ คือ ชาวพม่า (ภาพที่ 27) และชาวไทย (ภาพที่ 28) รวมทั้งวิเคราะห์ตามบริเวณที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อมากที่สุดคือที่จังหวัดตาก (ภาพที่ 29) แล้วไม่พบความแตกต่างของการติดเชื้อในแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ ($p > 0.05$) อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์ตามลักษณะอาการของธาลัสซีเมียแล้วไม่พบความแตกต่างของการติดเชื้อเช่นเดียวกัน ($p > 0.05$) (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 26 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมีย

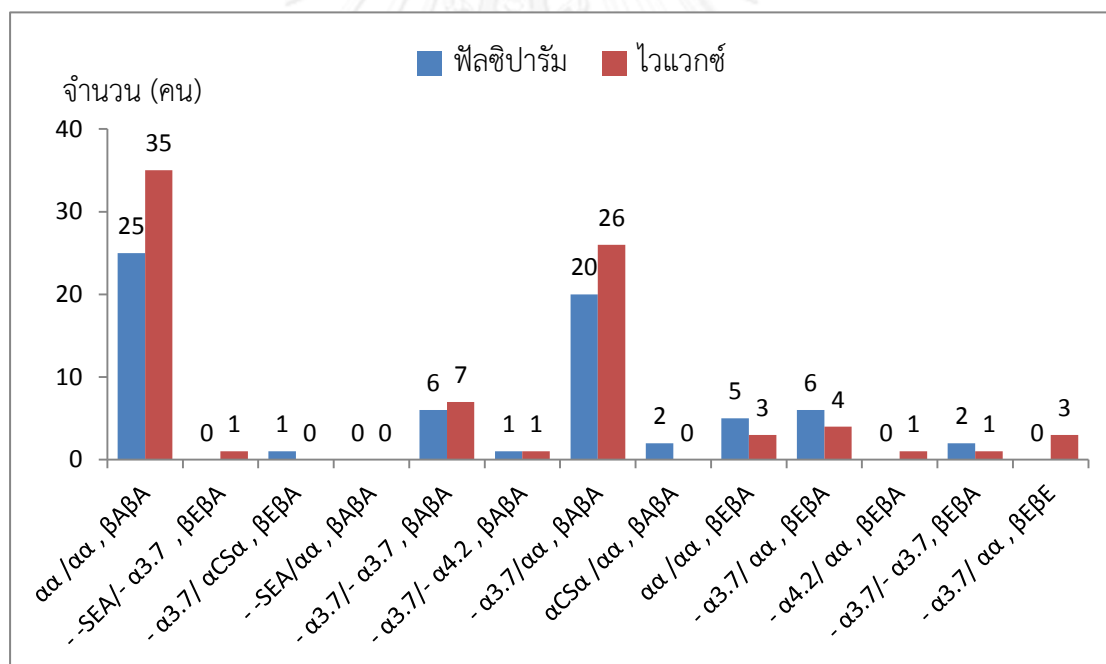
* Fisher's exact test ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดการกลายพันธุ์ของฮาลัสซีเมียกับการติดเชื้อ
มาลาเรีย

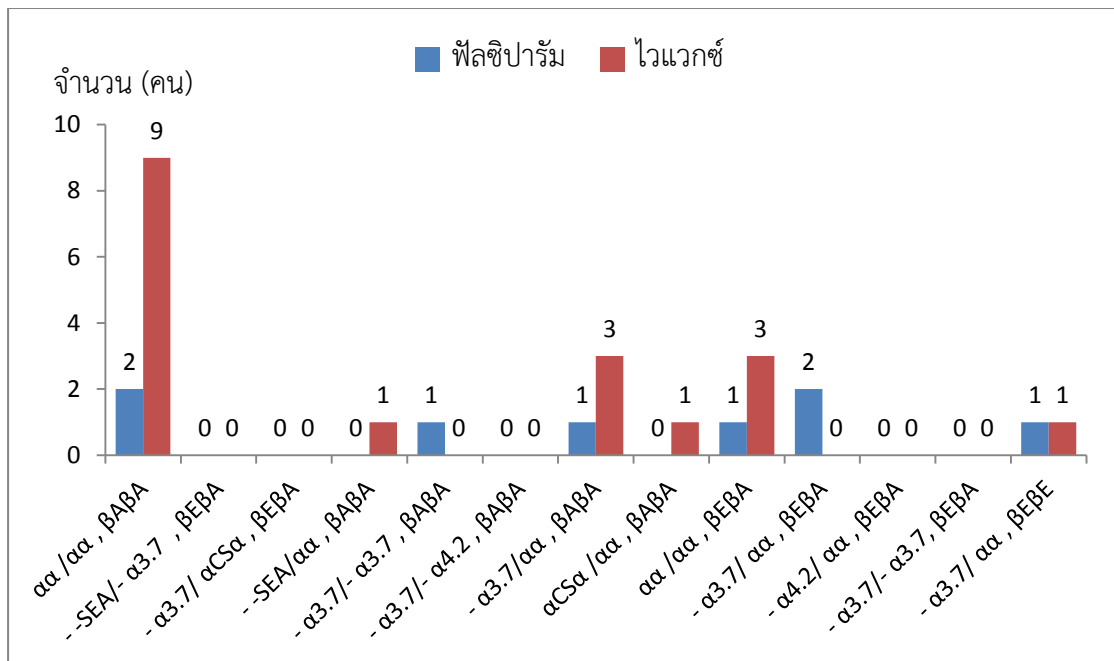
Genotype	ฟิลิปปินส์	ไต้หวัน	<i>p</i> -value ^a	Relative Risk (95% CI)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	31 (36.9%)	53 (63.1%)	-	-
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^A\beta^A$	7 (50.0%)	7 (50.0%)	0.352	1.355 (0.748–2.453)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	23 (41.1%)	33 (58.9%)	0.620	1.113 (0.731 - 1.694)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^E$	6 (46.2%)	7 (53.8%)	0.523	1.251 (0.653 - 2.396)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^E$	10 (71.4%)	4 (28.6%)	0.020^b	1.935 (1.255 - 2.986)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^E$	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0.416 ^b	0.452 (0.074 - 2.762)

^a χ^2 test

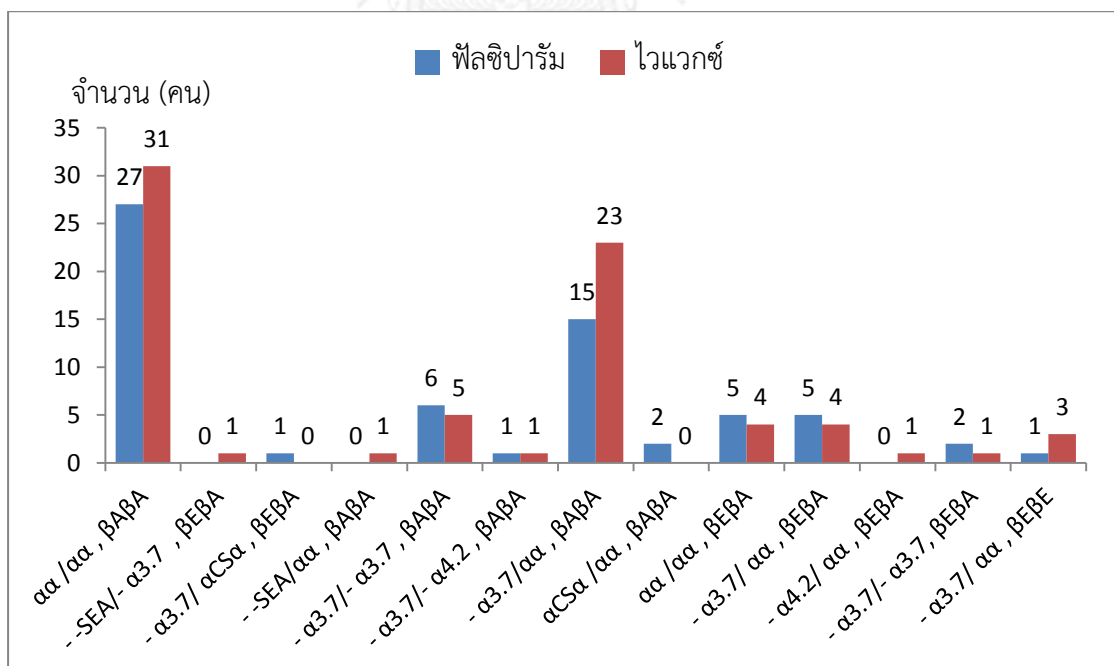
^b Fisher's exact test



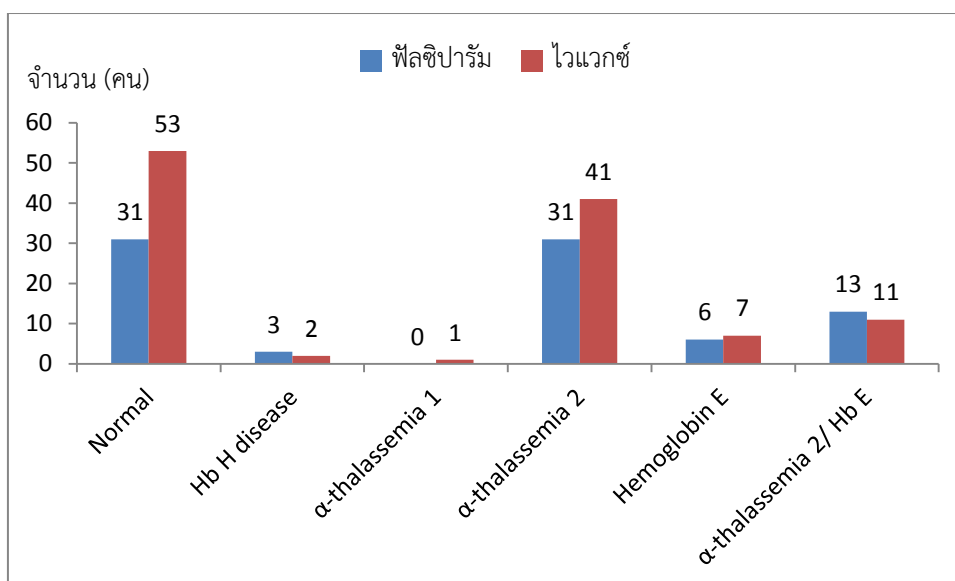
ภาพที่ 27 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของฮาลัสซีเมียในกลุ่ม
ผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติพม่า



ภาพที่ 28 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติไทย



ภาพที่ 29 ชนิดของเชื้อที่ได้รับแยกตามชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาจากจังหวัดตาก



ภาพที่ 30 ชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย

4.7.3 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามความรุนแรงของมาลาเรีย

จากการเก็บข้อมูลพบผู้ป่วยที่มีอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงจำนวน 12 ใน 199 คน (ร้อยละ 6.0) ซึ่งแบ่งตามลักษณะของอาการที่พบในผู้ป่วยที่มีอาการขั้นรุนแรงทั้ง 12 คน ได้เป็น Anemia 1 คน (ร้อยละ 0.5) Cerebral malaria 3 คน (ร้อยละ 1.5) Hyperparasitemia 3 คน (ร้อยละ 1.5) Liver failure 4 คน (ร้อยละ 2.0) และ Hyperparasitemia ร่วมกับ Liver failure 1 คน (ร้อยละ 0.5) ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัมทั้งหมด พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับอาการของมาลาเรีย ($p < 0.05$) โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงทั้งหมดเกิดจากการติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัม (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับพยาธิสภาพของมาลาเรียขั้นรุนแรง

Plasmodium	Severe	Uncomplicated	Total	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a
<i>P.falciparum</i>	12 (14.3)	72 (85.7)	84 (100.0)	-
<i>P.vivax</i>	0 (0.0)	115 (100.0)	115 (100.0)	-
Total	12 (6.0)	187 (94.0)	199 (100.0)	0.000

^a Fisher's exact test

จากกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง (uncomplicated malaria) พบผู้ที่มีอาการของมาลาเรียปานกลาง (moderate uncomplicated malaria) จำนวน 25 ใน 187 คน (ร้อยละ 13.4) แบ่งเป็นผู้ที่มีอาการ Hyperpyrexia 9 คน (ร้อยละ 4.8) Hyperbilirubinemia 9 คน (ร้อยละ 4.8) และ Hyperparasitemia 7 คน (ร้อยละ 3.7) เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัม 13 คน และไวแวกซ์ 12 คน ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับอาการของมาลาเรียระดับปานกลาง ($p>0.05$) โดยพบว่าทั้งเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซ์ก่อให้เกิดอาการของมาลาเรียระดับปานกลางได้ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11) แต่มีแนวโน้มว่าผู้ที่มี Hyperbilirubinemia จะพบมากในผู้ที่ติดเชื้อชนิดไวแวกซ์ ($p>0.05$) และผู้ที่มี Hyperparasitemia เป็นผู้ที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัม ($p=0.001$)

ตารางที่ 11 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับพยาธิสภาพของมาลาเรียขั้นปานกลาง

Plasmodium	Moderately	Uncomplicated	Total	Relative Risk (95% CI) p -value ^a
<i>P.falciparum</i>	13 (18.1)	59 (81.9)	72 (100.0)	1.730
<i>P.vivax</i>	12 (10.4)	103 (89.6)	115 (100.0)	(0.836-3.581)
Total	25 (13.4)	162 (86.6)	187 (100.0)	0.185

^a χ^2 test

4.7.3.1 ความชุกของธาลัสซีเมียตามลักษณะการกลายพันธุ์ (genotype) แยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงแสดงในตารางที่ 12 และแยกตามมาลาเรียระดับปานกลาง (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง

Severe malaria	Genotype (N)				Total
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^E$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^E$	
Anemia	0	1	0	0	1
Cerebral malaria	0	1	0	2	3
Hyperparasitemia	0	1	1	1	3
Liver failure	3	0	0	1	4
Hyperparasitemia with Liver failure	0	0	1	0	1
Total	4	3	1	4	12

ตารางที่ 13 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นปานกลาง

Genotype	Moderately malaria (N; <i>pf:pv</i>)			Total
	Hyperpyrexia	Hyperbilirubinemia	Hyperparasitemia	
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	2 : 1	1 : 8	1 : 0	4 : 9
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	2 : 1	-	3 : 0	5 : 1
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^A\beta^A$	1 : 1	-	1 : 0	2 : 1
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^E$	0 : 1	-	1 : 0	1 : 1
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^A\beta^E$	-	-	1 : 0	1 : 0
Total	5 : 4	1 : 8	7 : 0	13 : 12

4.7.3.2 ความชุกของธาลัสซีเมียตามลักษณะอาการของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงแสดงในตารางที่ 14 และแยกตามมาลาเรียระดับปานกลาง (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง

Severe malaria	Thalassemia (N)				Total
	Normal	α -thal 2	Hemoglobin E	α -thal 2/ Hb E	
Anemia	0	1	0	0	1
Cerebral malaria	0	1	0	2	3
Hyperparasitemia	0	1	1	1	3
Liver failure	3	0	0	1	4
Hyperparasitemia with Liver failure	0	0	1	0	1
Total	4	3	1	4	12

ตารางที่ 15 ความชุกของธาลัสซีเมียแยกตามชนิดอาการของมาลาเรียขั้นปานกลาง

Moderately	Thalassemia (N; <i>pf:pv</i>)			Total
	Normal	α -thal 2	α -thal 2/ Hb E	
Hyperpyrexia	2 : 1	3 : 2	0 : 1	5 : 4
Hyperbilirubinemia	1 : 8	-	-	1 : 8
Hyperparasitemia	1 : 0	4 : 0	2 : 0	7 : 0
Total	4 : 9	5 : 1	2 : 1	13 : 12

4.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกจากการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ที่พบการกลายพันธุ์แบบแอลฟาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และกลุ่ม control

ผู้ป่วยมาลาเรียทั้งหมด 199 คน มีอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง 12คน พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์ชนิด $\beta^E\beta^A$ มีความเสี่ยงต่ออาการมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่ากลุ่ม $\beta^A\beta^A$ ประมาณ 3 เท่า (RR=3.463, 95% CI = 1.171-10.246; $p = 0.020$) (ตารางที่ 16) และเมื่อพิจารณาบทบาทของ $\alpha^{3.7}$ ร่วมกับ β^E พบว่ากลุ่มที่พบการกลายพันธุ์ชนิด $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ มีความเสี่ยงต่อมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่ากลุ่ม $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ร่วมกับ β^A/β^A ถึง 6 เท่า (RR=6.000, 95%

CI=1.693-21.262; $p = 0.014$) อีกทั้งมีความเสี่ยงมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่พบ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ หรือ $\beta^E\beta^A$ เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง $\{-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^A\beta^A$ (RR = 1.125, 95% CI = 0.262-4.836; $p = 1.000$), $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ (RR = 1.615, 95% CI = 0.195-13.315; $p = 0.521$) (ตารางที่ 17) แต่เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ผู้ป่วยได้รับแล้วไม่พบความสัมพันธ์ทั้งในผู้ป่วยที่ติดทั้งเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซ์อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยสังเกตได้จาก 95% CI ที่มีช่วงค่าที่กว้าง จึงทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวแต่มีแนวโน้มว่าผู้ป่วยกลุ่ม $\beta^E\beta^A$ จะมีความเสี่ยงต่ออาการมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่ากลุ่ม $\beta^A\beta^A$ ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัม

ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงจำนวน 187 คน มีอาการของมาลาเรียระดับปานกลาง 25 คน ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียกับความเสี่ยงต่ออาการของมาลาเรียระดับปานกลาง (ตารางที่ 18 และ 19) แต่เมื่อแยกวิเคราะห์ในแต่ละกลุ่มอาการ พบแนวโน้มการต้านต่ออาการ Hyperbilirubinemia ในผู้ป่วยกลุ่ม $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ($p = 0.012$) อีกทั้งพบความสัมพันธ์เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดไวแวกซ์ ($p = 0.021$) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีอาการ Hyperbilirubinemia ทั้งหมดเป็นผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิดใดๆ (ร้อยละ 100) (ตารางที่ 20 และ 21) เนื่องด้วยกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยอันเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ จึงไม่สามารถคำนวณค่าทางสถิติได้ แต่อย่างไรก็ดีจากค่าจำนวนผู้ป่วยที่พบสามารถบอกเป็นแนวโน้มได้ว่าผู้ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ สามารถลดอาการ Hyperbilirubinemia ในผู้ป่วยมาลาเรียที่ติดเชื้อชนิดไวแวกซ์ได้

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์เมื่อแยกผู้ป่วยตามลักษณะของธาลัสซีเมีย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง (ตารางที่ 22) และอาการของมาลาเรียระดับปานกลาง (ตารางที่ 23) กับลักษณะอาการของธาลัสซีเมีย

ตารางที่ 16 ลักษณะของมาลาเรียขึ้นรุนแรงแยกตามจีไทป์ของแอนดพลาซมาสปีชีส์และฮีโมโกลบินอี

Thalassemia Gene	Total						<i>P.falciparum</i>						<i>P.vivax</i>						
	Severe		Uncomplicated		Relative Risk (95% CI)		Severe		Uncomplicated		Relative Risk (95% CI)		Severe		Uncomplicated		Relative Risk (95% CI)		
	n	%	n	%	p-value ^a	CI	n	%	n	%	p-value ^a	CI	n	%	n	%	p-value ^a	CI	
$\alpha^{3.7}$	Normal	5 (4.7)	102 (95.3)	5 (11.9)	37 (88.1)	-	-	0 (0.0)	65 (100.0)	0 (0.0)	65 (100.0)	-	-	0 (0.0)	65 (100.0)	0 (0.0)	65 (100.0)	-	-
	Heterozygous	7 (9.3)	68 (90.7)	7 (21.2)	26 (78.8)	1.997	(0.659-6.055)	7 (21.2)	26 (78.8)	1.782	(0.622-5.108)	0 (0.0)	42 (100.0)	0 (0.0)	42 (100.0)	0 (0.0)	42 (100.0)	-	-
						0.212				0.348									
β^E	Normal	7 (4.4)	153 (95.6)	7 (10.9)	57 (89.1)	-	-	7 (10.9)	57 (89.1)	-	-	0 (0.0)	96 (100.0)	0 (0.0)	96 (100.0)	0 (0.0)	96 (100.0)	-	-
	Heterozygous	5 (15.2)	28 (84.8)	5 (26.3)	14 (73.7)	3.463	(1.171-10.246)	5 (26.3)	14 (73.7)	2.406	(0.861-6.720)	0 (0.0)	14 (100.0)	0 (0.0)	14 (100.0)	0 (0.0)	14 (100.0)	-	-
						0.020				0.134									
	Homozygous	0 (0.0)	6 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	-	-	0 (0.0)	1 (100.0)	-	-	0 (0.0)	5 (100.0)	0 (0.0)	5 (100.0)	0 (0.0)	5 (100.0)	-	-
						1.000 ^b				1.000 ^b									

^a χ^2 test

^b Fisher's exact test

ตารางที่ 17 ลักษณะของมาลาเรียที่รุนแรงในผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แอสพาธาไลต์ซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกัน

Genotype	Total				<i>P. falciparum</i>				<i>P. vivax</i>			
	Severe	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI)	p-value ^a	Severe	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI)	p-value ^a	Severe	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI)	p-value ^a
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	4 (4.8)	80 (95.2)	-	-	4 (12.9)	27 (87.1)	-	-	0 (0.0)	53 (100.0)	-	-
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^A\beta^A$	3 (5.4)	53 (94.6)	1.125 (0.262-4.836)	1.000	3 (13.0)	20 (87.0)	1.011 (0.250-4.085)	1.000	0 (0.0)	33 (100.0)	-	-
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}, \beta^A\beta^A$	0 (0.0)	14 (100.0)	-	-	0 (0.0)	7 (100.0)	-	-	0 (0.0)	7 (100.0)	-	-
$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^E\beta^E$	1 (7.7)	12 (92.3)	1.615 (0.195-13.351)	1.000	1 (16.7)	5 (83.3)	1.292 (0.173-9.634)	1.000	0 (0.0)	7 (100.0)	-	-
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^E$	4 (28.6)	10 (71.4)	6.000 (1.693-21.262)	0.014	4 (40.0)	6 (60.0)	3.100 (0.944-10.175)	1.000	0 (0.0)	4 (100.0)	-	-
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^E\beta^E$	0 (0.0)	6 (100.0)	-	-	0 (0.0)	1 (100.0)	-	-	0 (0.0)	5 (100.0)	-	-

^a Fisher's exact test

ตารางที่ 18 ลักษณะของมาลาเรียระดับปานกลางแยกตามจีไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี

Thalassemia Gene	Total			<i>P.falciparum</i>			<i>P.vivax</i>		
	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a
$\alpha^{3.7}$	Normal	13 (12.7)	89 (87.3)	4 (10.8)	33 (89.2)	-	13 (12.7)	89 (87.3)	-
	Heterozygous	8 (11.8)	60 (88.2)	2 (23.1)	20 (76.9)	0.913 (0.404-2.108)	8 (11.8)	60 (88.2)	0.923 (0.404-2.108)
	Homozygous	4 (23.5)	13 (76.5)	3 (33.3)	6 (66.7)	1.000 (0.682-4.999)	4 (23.5)	13 (76.5)	0.849 (0.666-1.153)
β^E	Normal	22 (14.4)	131 (85.6)	11 (19.3)	46 (80.7)	-	22 (14.4)	131 (85.6)	-
	Heterozygous	3 (10.7)	25 (89.3)	2 (14.3)	12 (85.7)	0.745 (0.239-2.323)	3 (10.7)	25 (89.3)	0.745 (0.239-2.323)
	Homozygous	0 (0.0)	6 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0.771 ^b	0 (0.0)	6 (100.0)	0.771 ^b
						-			-
						1.000 ^b			1.000 ^b

^a χ^2 test

^b Fisher's exact test

ตารางที่ 19 ลักษณะของมาลาเรียระดับปานกลางในผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกัน

Genotype	Total			<i>P.falciparum</i>			<i>P.vivax</i>		
	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a
$\alpha\alpha/\alpha\alpha,\beta^A\beta^A$	13 (16.2)	67 (83.8)	-	4 (14.8)	23 (85.2)	-	13 (16.2)	67(83.8)	-
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha,\beta^A\beta^A$	6 (11.3)	47 (88.7)	0.697 (0.282-1.719) 0.462	5 (25.0)	15 (75.0)	1.688 (0.518-5.496) 0.465 ^b	6 (11.3)	47 (88.7)	0.697 (0.282-1.719) 0.426
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7},\beta^A\beta^A$	3 (21.4)	11 (78.6)	1.319 (0.430-4.040) 0.701 ^b	2 (28.6)	5 (71.4)	1.929 (0.439-8.471) 0.580 ^b	3 (21.4)	11 (78.6)	1.319 (0.430-4.040) 0.701 ^b
$\alpha\alpha/\alpha\alpha,\beta^E\beta^E$	0 (0.0)	12 (100.0)	-	0 (0.0)	5 (100.0)	-	0 (0.0)	12 (100.0)	-
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha,\beta^E\beta^E$	2 (20.0)	8 (80.0)	0.204 ^b	1 (16.7)	5 (83.3)	1.000	-	-	-
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7},\beta^E\beta^E$	0 (0.0)	6 (100.0)	-	0 (0.0)	1 (100.0)	1.000 ^b	0 (0.0)	6 (100.0)	-
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7},\beta^E\beta^E$	1 (33.3)	2 (66.7)	2.051 (0.384-10.961) 0.430 ^b	1 (50.0)	1 (50.0)	3.375 (0.645-17.661) 0.320 ^b	1 (33.3)	2 (66.7)	2.051 (0.384-10.961) 0.430 ^b

^a χ^2 test

^b Fisher's exact test

ตารางที่ 20 ลักษณะของมาลาเรียแบบ Hyperbilirubinemia แยกตามจีไทป์ของแอนดพาลัสซีเมียและอีโมโกลบินอี

Thalassemia Gene	Total			<i>P.falciparum</i>			<i>P.vivax</i>		
	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a
$\alpha^{3.7}$	Normal	9 (8.8)	93 (91.2)	1 (2.7)	36 (97.3)	-	8 (12.3)	57 (87.7)	-
	Heterozygous	0 (0.0)	68 (100.0)	0 (0.0)	26 (100.0)	-	0 (0.0)	42 (100.0)	-
						0.012			0.021
β^E	Homozygous	0 (0.0)	17 (100.0)	0 (0.0)	9 (100.0)	-	0 (0.0)	8 (100.0)	-
						0.355			0.586
						1.000			1.000
β^E	Normal	9 (5.9)	144 (94.1)	1 (1.8)	56 (98.2)	-	8 (8.3)	88 (91.7)	-
	Heterozygous	0 (0.0)	28 (100.0)	0 (0.0)	14 (100.0)	-	0 (0.0)	14 (100.0)	-
						0.358			0.593
β^E	Homozygous	0 (0.0)	6 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	-	0 (0.0)	5 (100.0)	-
						1.000			1.000
						1.000			1.000

^aFisher's exact test

ตารางที่ 21 ลักษณะของมาลาเรียแบบ Hyperbilirubinemia ในผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีร่วมกัน

Genotype	Total			<i>P.falciparum</i>			<i>P.vivax</i>		
	Moderately Uncomplicated	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a	Moderately Uncomplicated	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a	Moderately Uncomplicated	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a
$\alpha\alpha/\alpha\alpha,\beta^A\beta^A$	9 (11.2)	71 (88.8)	-	1 (3.7)	26 (96.3)	-	8 (15.1)	45 (84.9)	-
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha,\beta^A\beta^A$	0 (0.0)	53 (100.0)	-	0 (0.0)	20 (100.0)	-	0 (0.0)	33 (100.0)	-
			-			-			-
			0.011			0.253			0.021
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7},\beta^A\beta^A$	0 (0.0)	14 (100.0)	-	0 (0.0)	7 (100.0)	-	0 (0.0)	7 (100.0)	-
			-			-			-
			0.347			1.000			0.578
$\alpha\alpha/\alpha\alpha,\beta^E\beta^E$	0 (0.0)	12 (100.0)	-	0 (0.0)	5 (100.0)	-	0 (0.0)	7 (100.0)	-
			-			-			-
			0.600			1.000			0.578
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha,\beta^E\beta^E$	0 (0.0)	10 (100.0)	-	0 (0.0)	6 (100.0)	-	0 (0.0)	4 (100.0)	-
			-			-			-
			0.590			1.000			1.000
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha,\beta^E\beta^E$	0 (0.0)	6 (100.0)	-	0 (0.0)	1 (100.0)	-	0 (0.0)	5 (100.0)	-
			-			-			-
			1.000			1.000			1.000

^aFisher's exact test

ตารางที่ 22 ลักษณะของมาลาเรียชนิดรุนแรงในผู้ป่วยแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย

Thalassemia	Total			<i>P.falciparum</i>			<i>P.vivax</i>		
	Severe	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a	Severe	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a	Severe	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) <i>p</i> -value ^a
Normal	4 (4.8)	80 (95.2)	-	4 (12.9)	27 (87.1)	-	-	53 (100.0)	-
Hb H disease	0 (0.0)	5 (100.0)	-	0 (0.0)	3 (100.0)	-	-	2 (100.0)	-
			-			-			
			1.000			1.000			
α -thal 2	3 (4.2)	69 (95.8)	0.875 (0.203-3.781)	3 (9.7)	28 (90.3)	0.750 (0.183-3.077)	-	41 (100.0)	-
			1.000			1.000			
Hemoglobin E	1 (7.7)	12 (92.3)	1.615 (0.195-13.351)	1 (16.7)	5 (83.3)	1.192 (0.173-9.634)	-	7 (80.0)	-
			0.521			1.000			
α -thal 2/ Hb E	4 (16.7)	20 (83.3)	3.500 (0.945-12.966)	4 (30.8)	9 (69.2)	2.385 (0.700-8.120)	-	11 (100.0)	-
			0.071			0.209			

^a Fisher's exact test

ตารางที่ 23 ลักษณะของมาลาเรียระดับปานกลางในผู้ป่วยแยกตามลักษณะของธาลัสซีเมีย

Thalassemia	Total			<i>P.falciparum</i>			<i>P.vivax</i>		
	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a	Moderately	Uncomplicated	Relative Risk (95% CI) p-value ^a
Normal	13 (16.2)	67 (83.8)	-	4 (14.8)	23 (85.2)	-	9 (17.0)	44 (83.0)	-
Hb H disease	0 (0.0)	5 (100.0)	-	0 (0.0)	3 (100.0)	-	0 (0.0)	2 (100.0)	-
			-			-			-
			1.000			1.000			1.000
α-thal 2	9 (13.0)	60 (87.0)	0.803 (0.366-1.762)	3 (25.0)	21 (75.0)	1.688 (0.557-5.115)	2 (4.9)	39 (95.1)	0.287 (0.066-1.258)
			0.648			0.503			0.106
Hemoglobin E	0 (0.0)	12 (100.0)	-	0 (0.0)	5 (100.0)	-	0 (0.0)	7 (100.0)	-
			-			-			-
			0.204			1.000			0.580
α-thal 2/ Hb E	3 (15.0)	17 (85.0)	0.923 (0.291-2.932)	2 (22.2)	7 (77.8)	1.500 (0.328-6.862)	1 (9.1)	10 (90.9)	0.535 (0.075-3.805)
			1.000			0.627			1.000

^a Fisher's exact test

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีนที่สร้างโปรตีนโกลบินในเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีภาวะโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงที่ไม่สมบูรณ์และแตกได้ง่ายอันเกิดจากความผิดปกติของฮีโมโกลบิน ธาลัสซีเมียสามารถพบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณที่มีการระบาดของมาลาเรีย จึงมีการตั้งข้อสังเกตว่าธาลัสซีเมียหรือโรคเลือดบางชนิดได้รับการคัดเลือกตามธรรมชาติให้เกิดขึ้นและคงอยู่ต่อไปเพื่อต้านมาลาเรีย ตัวอย่างของธาลัสซีเมียที่มีรายงานว่าสามารถต้านทานมาลาเรียได้ เช่น ภาวะโลหิตจางชนิดซิกเคิลแบบ heterozygote (sickle-cell heterozygote) (38) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิด $\alpha^{3.7}$ (34, 39, 40) ฮีโมโกลบินอี (8) และ α^{SEA} (41) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีงานวิจัยที่ให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน เช่น จากการศึกษาในเด็กชาวแอฟริกาที่พบว่าถึงแม้ $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ จะสามารถต้านทานต่อมาลาเรียที่รุนแรงได้ แต่กลับไม่พบผลดังกล่าวในกลุ่ม $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$ (34) ซึ่งต่างจากการศึกษาในปาปัวนิวกินีที่พบว่า $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$ สามารถต้านทานต่อมาลาเรียที่รุนแรงได้ แต่กลับไม่พบในกลุ่ม $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (39) จากรายงานที่ผ่านๆ มาแสดงให้เห็นว่าบทบาทของธาลัสซีเมียต่อการต้านมาลาเรียยังไม่เป็นที่ชัดเจนและมีความขัดแย้งกันทั้งชนิดของการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมีย ชนิดของจีโนไทป์ ความสัมพันธ์กับอาการของมาลาเรียที่มีความหลากหลายทั้งกลุ่มที่รุนแรงและไม่รุนแรง รวมทั้งความแตกต่างของกลุ่มประชากรที่ศึกษา ซึ่งเป็นปัญหาและอุปสรรคต่อการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียเป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงศึกษาความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยมาลาเรียในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อีกทั้งศึกษาบทบาทของธาลัสซีเมียชนิดที่พบบ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คือ $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, α^{SEA} , α^{FIL} , และ α^{CS} และ HbE ต่อการติดเชื้อมาลาเรียทั้งชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซ์โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางคลินิกและความเสี่ยงของโรคทั้งสอง

จากการศึกษาผู้ป่วยมาลาเรียที่มีเชื้อชาติต่างๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2554 ถึงพฤศจิกายน 2555 เป็นระยะเวลา 19 เดือน มีผู้ป่วยทั้งหมด 275 คน ไม่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก จำนวน 76 คน จากสาเหตุหลายประการ ได้แก่

1. ผู้ป่วยที่มีข้อมูลไม่ครบถ้วน จำนวน 20 คน
2. กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียหลายชนิดร่วมกัน จำนวน 5 คน ซึ่งนอกจากจะเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยจำนวนตัวอย่างที่น้อยแล้ว การติดเชื้อมากมายยังทำให้เกิด cross immunity ระหว่างเชื้อ (11) อันจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อบทบาทที่แท้จริงของธาลัสซีเมียในผู้ป่วยได้
3. ผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จำนวน 32 คน เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD มีบทบาทต่อการต้านมาลาเรียได้
4. ผู้ป่วยที่มีค่า MCV<80 fl แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ธาลัสซีเมียชนิดใดๆ ที่ทำการตรวจในการศึกษานี้ จำนวน 19 คน เนื่องจากคาดว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้น่าจะเป็น iron deficiency หรือมีการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาหรือเบต้าโกลบินชนิดอื่นๆ ที่ผู้วิจัยไม่สามารถตรวจพบได้จากการศึกษานี้ ซึ่งอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ข้อมูล

ด้วยเหตุนี้จึงคงเหลือผู้ป่วยเข้าร่วมในโครงการวิจัย 199 คน เป็นเพศชาย ร้อยละ 95.5 หญิง ร้อยละ 4.5 แบ่งเป็นชาวพม่าร้อยละ 75.4 ไทยร้อยละ 13.1 กะเหรี่ยงร้อยละ 5.5 กัมพูชาร้อยละ 3.0 ลาวและมอญร้อยละ 1.3 โดยตัวอย่างที่ศึกษาส่วนใหญ่เป็นเชื้อชาติพม่า และพบเพศชายมากกว่าเพศหญิง เนื่องจากผู้ป่วยโรคมาลาเรียส่วนมากจะเป็นกลุ่มผู้ใช้แรงงานชาวกะเหรี่ยงสัญชาติพม่าที่เข้ามาทำงานในประเทศไทย โดยผ่านเข้ามาทางจังหวัดตาก ซึ่งในแต่ละปีจะพบผู้ป่วยโรคมาลาเรียสูงที่สุดในบริเวณนี้ อีกทั้งพบว่าอายุเฉลี่ยของกลุ่มประชากรที่ศึกษาคือ 28 ปี หรือกลุ่มวัยทำงาน โดยผู้ป่วยเพศหญิงมีอายุเฉลี่ยสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t -test, $p = 0.006$) หญิง (37.4 ± 13.3 ปี) ชาย (27.6 ± 9.7 ปี) อาจเป็นเพราะเพศหญิงที่ติดเชื้อมาลาเรียไม่ใช่กลุ่มผู้ที่เข้ามาขายแรงงาน หากแต่เป็นผู้ที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย ส่วนในเพศชายจะอยู่ในช่วงวัยทำงาน ขณะอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มเชื้อชาติไม่มีความแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์เชื้อมาลาเรียที่ผู้ป่วยได้รับพบว่า ผู้ป่วยมาลาเรียในการศึกษาส่วนใหญ่ได้รับเชื้อไอแว็กซ์ คิดเป็นร้อยละ 57.8 ของผู้ป่วยทั้งหมด ยกเว้นผู้ป่วยเชื้อชาติลาวทั้งหมดได้รับเชื้อชนิดฟัลซิพารัมเท่านั้น เมื่อวิเคราะห์จากภูมิลาเนาของผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยมีภูมิลาเนาที่ต่างกันและได้รับเชื้อมาลาเรียมาจากคนละสถานที่ ซึ่งมีการกระจายของเชื้อมาลาเรียที่แตกต่างกัน โดยส่วนมากผู้ป่วยในกลุ่มที่ศึกษาได้รับเชื้อมาจากจังหวัดตากซึ่งพบการติดเชื้อชนิดไอแว็กซ์มากกว่าฟัลซิพารัม แต่อย่างไรก็ตาม

ตามเมื่อวิเคราะห์ชนิดของเชื้อที่ได้รับไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ เพศ และเชื้อชาติ (χ^2 test, $p > 0.05$) กล่าวคือผู้ป่วยทั้งเพศชายและหญิง ทุกช่วงอายุและทุกเชื้อชาติ สามารถติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซีได้ไม่แตกต่างกัน

5.1 ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคมมาลาเรีย

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาและเบต้าโกลบินชนิด $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, α^{SEA} , α^{FIL} , α^{CS} และ β^E ในผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 199 คน พบการกลายพันธุ์ 115 คน (ร้อยละ 57.8) โดยค่าความถี่อัลลีลของ $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, α^{SEA} , α^{CS} และ β^E มีค่า 0.274, 0.008, 0.005, 0.010 และ 0.113 ตามลำดับแต่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด α^{FIL} โดยพบการกลายพันธุ์น้อยกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมมาลาเรีย เช่น การศึกษาทางตอนใต้ของพม่า โดยพบความถี่ของแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 37.5 และ 20.3 ตามลำดับ (42) การวิเคราะห์ความถี่อัลลีล $\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, α^{SEA} , α^{CS} และ β^E โดยใช้ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ไม่พบความแปรปรวนไปจากกฎของ Hardy-Weinberg แสดงถึงความสมดุลของอัลลีลกลายพันธุ์ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

5.2 ชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับกับมาลาเรียขั้นรุนแรง และชนิดการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมีย

ผู้ป่วยที่มีอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัม ซึ่งเป็นที่รู้กันอยู่แล้วว่าเป็นชนิดที่ก่อโรคร้ายแรงที่สุด ขณะที่ลักษณะอาการของมาลาเรียระดับปานกลางพบได้ทั้งในผู้ที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและไวแวกซีได้เท่าๆ กัน (13 และ 12 คน ตามลำดับ) แต่ในลักษณะอาการ Hyperbilirubinemia กลับพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวแวกซีมากกว่าฟัลซิพารัมสอดคล้องกับการศึกษาของ Andrade และคณะ ที่พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวแวกซีจะพบการกระตุ้นกระบวนการอักเสบและเกิดความไม่สมดุลของ cytokine ซึ่งจะเห็นได้จากระดับของ total bilirubin ที่สูงในช่วงก่อนการรักษา และลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากการรักษา (43) และ ในลักษณะอาการ Hyperparasitemia พบเฉพาะในผู้ที่ติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัมเท่านั้น เนื่องจากปริมาณของเชื้อชนิดไวแวกซีในกระแสเลือดจะไม่เกิน 2% ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดลักษณะอาการที่รุนแรง (44)

ผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์ชนิด $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อชนิด พิลาซิปารัมมากกว่าไวแวกซ์เป็น 2 เท่า ของผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ (RR = 1.935, 95% CI = 1.255-2.986; $p = 0.020$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผู้ป่วย $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ ที่พบส่วนใหญ่เป็นชาวลาวซึ่งติดเชื้อพิลาซิปารัมทั้งหมด จึงส่งผลกระทบต่ออ้อมต่อการวิเคราะห์ดังกล่าวมากกว่าผลของ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ กับชนิดของเชื้อโดยตรง โดยเมื่อพิจารณาแยกตามเชื้อชาติ (เชื้อชาติพม่าและไทย) ของผู้ป่วยแล้วไม่พบความแตกต่างของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ กับผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ ($p > 0.05$) แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาแยกตามบริเวณที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อมา เช่น จังหวัดตาก แล้วไม่พบความแตกต่างเช่นเดียวกัน การระบาดของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่น่าจะมีผลต่อการติดเชื้อมากกว่าชนิดของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย

5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี ต่ออาการทางคลินิกของโรคมาลาเรีย

จากการวิเคราะห์ผู้ป่วยมาลาเรีย 199 คน พบอาการของมาลาเรียที่รุนแรง 12 คน คิดเป็นร้อยละ 6.0 ผลการวิเคราะห์เมื่อแยกผู้ป่วยตามลักษณะของธาลัสซีเมีย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง และอาการของมาลาเรียระดับปานกลาง กับลักษณะอาการของธาลัสซีเมีย แต่เมื่อแยกผู้ป่วยตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมียแล้วพบว่าผู้ป่วยกลุ่ม $\beta^E\beta^A$ มีความเสี่ยงต่อภาวะมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่ากลุ่ม $\beta^A\beta^A$ ประมาณ 3 เท่า (RR = 3.463, 95% CI = 1.171-10.246; $p = 0.020$) แต่ในการกลับกันผู้ป่วยกลุ่ม $\beta^E\beta^E$ มีแนวโน้มต่อการต้านภาวะมาลาเรียขั้นรุนแรงเนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้ทั้งหมดไม่พบอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรงเลย แต่เมื่อพิจารณาในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อชนิดพิลาซิปารัมแล้วไม่พบความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มความเสี่ยงของอาการมาลาเรียขั้นรุนแรง พบเพียงแนวโน้มต่อการเพิ่มความเสี่ยงเท่านั้น (RR = 2.406, 95% CI = 0.861-6.720; $p = 0.134$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Naka และคณะที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อพิลาซิปารัมทางตอนเหนือของประเทศไทยโดยผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างของค่าความถี่อัลลีล β^E ในกลุ่มที่พบและไม่พบ Cerebral malaria (10) นอกจากนี้เมื่อผู้วิจัยพิจารณาผู้ป่วยกลุ่ม $\beta^E\beta^A$ ที่มีมาลาเรียขั้นรุนแรงเป็นรายๆ พบว่าผู้ป่วยจำนวน 4 ใน 5 รายมี $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มความเสี่ยงต่ออาการมาลาเรียขั้นรุนแรงอาจเป็นผลมาจาก $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ และกลุ่ม $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ที่มี $\beta^E\beta^A$ ร่วมด้วย ต่ออาการของ

มาลาเรียขั้นรุนแรง เมื่อพิจารณาเพียง $-\alpha^{3.7}$ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยกลุ่ม $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ไม่พบความสัมพันธ์ทั้งด้านความเสี่ยงและการต้านทาน ขณะที่กลุ่มผู้ป่วย $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ มีแนวโน้มต่อการต้านมาลาเรียขั้นรุนแรง โดยพบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้ทั้งหมดไม่พบอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Allene และคณะ ที่ไม่พบผลการต้านต่อมาลาเรียขั้นรุนแรงใน $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (OR=0.66, 95% CI=0.37-1.2; $p = 0.20$) แต่พบในกลุ่ม $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (OR=0.04, 95% CI=0.22-0.74; $p = 0.03$) (39) นอกจากนี้ Fairhurst และคณะ ยังได้อธิบายบทบาทของ $-\alpha^{3.7}$ ต่อการต้านทานมาลาเรียที่รุนแรงไว้ว่า $-\alpha^{3.7}$ จะไปลดความสามารถในการยึดเกาะของ *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญสำหรับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาซึมเพื่อใช้ในการยึดเกาะกับ MVECs จึงทำให้เม็ดเลือดแดงผิดปกติที่ติดเชื้อถูกกำจัดได้มากขึ้น (45)

จากการวิเคราะห์บทบาทของ $-\alpha^{3.7}$ ร่วมกับ β^E ต่ออาการมาลาเรียขั้นรุนแรงในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด พบว่าผู้ป่วยที่มี $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ร่วมกับ $\beta^E\beta^A$ จะมีความเสี่ยงต่อมาลาเรียขั้นรุนแรงมากกว่ากลุ่ม $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ร่วมกับ β^A/β^A ถึง 6 เท่า (RR=6.000, 95% CI=1.693-21.262; $p = 0.014$) อีกทั้งมีความเสี่ยงมากกว่าผู้ป่วยที่เป็น $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ หรือ β^A/β^E เพียงอย่างเดียวหนึ่ง ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วยที่มี $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ หรือ $\beta^E\beta^E$ เพียงอย่างเดียวหนึ่ง มีแนวโน้มที่จะต้านทานต่อมาลาเรียขั้นรุนแรงทั้งนี้สาเหตุที่แน่ชัดยังไม่สามารถสรุปได้ แต่อาจอธิบายด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Williams และคณะ ที่พบว่าเมื่อเกิดความผิดปกติร่วมกันของแอลฟาโกลบินและเบต้าโกลบิน เช่น α^+ และ HbS แล้วจะเปลี่ยนแปลงผลต่อการต้านทานมาลาเรียที่รุนแรง ดังเห็นได้จากการที่ไม่พบมาลาเรียขั้นรุนแรงในผู้ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด HbAS เช่นเดียวกับกลุ่ม HbAS ร่วมกับ heterozygous α^+ ที่ยังคงต้านทานมาลาเรียขั้นรุนแรงได้ (IRR = 0.11, 95% CI = 0.02-0.47; $p = 0.003$) แต่เมื่อพบ HbAS ร่วมกับ homozygous α^+ จะส่งผลให้ความสามารถต่อการต้านมาลาเรียที่รุนแรงของ HbS ลดลง (IRR = 0.90, 95% CI = 0.30-2.74; $p = 0.858$) โดยคาดว่าเป็นผลมาจากการที่ผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์แบบ HbAS ร่วมกับ homozygous α^+ มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด HbS น้อยกว่าชนิด HbA เนื่องจากสายแอลฟาโกลบินจะจับกับสายเบต้าโกลบินที่ปกติได้ดีกว่าสายเบต้าโกลบินผิดปกติ ดังนั้นหากเกิดการกลายพันธุ์ของแอลฟาโกลบิน จะทำให้มีปริมาณแอลฟาโกลบินลดลง ซึ่งจะทำให้ปริมาณของ HbS ในผู้ที่พบการกลายพันธุ์แบบ HbAS ร่วมกับ homozygous α^+ มีปริมาณลดลงจากตอนที่พบการกลายพันธุ์ชนิด HbAS อย่างเดียวทำให้ลดภาวะ

oxidative stress อันเกิดจาก HbS ซึ่งมีความสำคัญต่อการป้องกันมาลาเรียของผู้ที่เป็น sickle trait (12) ดังนั้นเมื่อติดเชื้อมาลาเรียจึงทำให้ประสิทธิภาพในการต้านมาลาเรียของ HbS ลดลง เชื่อจึงเจริญได้ดีและอาจเป็นสาเหตุของมาลาเรียขั้นรุนแรงได้

ขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบอาการของมาลาเรียขั้นรุนแรง พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ มีความเสี่ยงต่อภาวะ Hyperbilirubinemia น้อยกว่ากลุ่ม $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ และพบความสัมพันธ์เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวแวกซ์เท่านั้น ($p = 0.021$) โดยพบว่าผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ที่มีอาการ Hyperbilirubinemia ทั้งหมดเป็นผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิดใดๆ จึงพบแนวโน้มว่าการกลายพันธุ์ชนิด $\alpha^{3.7}$ อาจมีผลต่อการต้านภาวะ Hyperbilirubinemia ในผู้ป่วยมาลาเรียทั้งหมด ($p = 0.011$) กลไกการต้านทานยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจอธิบายด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ชนิด β^A/β^E ที่เมื่อติดเชื้อมาลาเรียจะเกิด hemolysis ได้น้อยกว่าเม็ดเลือดแดงที่ไม่พบการกลายพันธุ์จึงมีค่า total bilirubin น้อยกว่าผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ (46)

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแอลฟาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีมีบทบาทสำคัญทั้งต่อการต้านและส่งเสริมภาวะมาลาเรียที่รุนแรง แต่จะเป็นไปในทิศทางใดขึ้นอยู่กับลักษณะการกลายพันธุ์ จีโนไทป์ รวมทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนแอลฟาและเบต้าโกลบิน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางตรงในการอธิบายพยาธิสภาพของโรคมมาลาเรียภายใต้ภาวะแฝงของโรคธาลัสซีเมีย อีกทั้งเป็นประโยชน์ทางอ้อมต่อการนำผลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรง อีกทั้งเป็นการลดอัตราการตายของผู้ป่วยมาลาเรียขั้นรุนแรงได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าการศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์จากยีนไดยีนหนึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของโรคติดเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากกลไกการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อเป็นการทำงานร่วมกันของหลายๆ ยีนในร่างกาย

รายการอ้างอิง

1. มานิต อีระตันนิกานนท์, สุดสาคร ตูจันดา, สุวรรณชัย วัฒนายิ่งเจริญชัย. คู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ: ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2552. 1-42 p.
2. วรวรรณ ตันไพจิตร, สุทัศน์ ฟูเจริญ, ฉันทชัย สุระ. Clinical practice guidelines for diagnosis and management of thalassemia syndromes. มูนิธิโรโคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย, 2549.
3. วรวรรณ ตันไพจิตร. บทความพิเศษการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย วารสารโลหิตและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2548;15(3):197-202.
4. Fucharoen S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in southeast Asia. *Indian J Med Res.* 2011;134:498-506.
5. Lederberg J. J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. *Genetics.* 1999;153(1):1-3.
6. Fowkes FJ, Day KP. Alpha+ -thalassaemia and malaria in Melanesia: epidemiological perspectives. *P N G Med J.* 2008;51(3-4):131-7.
7. Krause MA, Diakite SA, Lopera-Mesa TM, Amaratunga C, Arie T, Traore K, et al. alpha-Thalassemia impairs the cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *PLoS One.* 2012;7(5):18.
8. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, et al. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe P falciparum malaria. *Blood.* 2002;100(4):1172-6.
9. Nagel RL, Raventos-Suarez C, Fabry ME, Tanowitz H, Sicard D, Labie D. Impairment of the growth of Plasmodium falciparum in HbEE erythrocytes. *J Clin Invest.* 1981;68(1):303-5.
10. Naka I, Ohashi J, Nuchnoi P, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K, et al. Lack of association of the HbE variant with protection from cerebral malaria in Thailand. *Biochem Genet.* 2008;46(11-12):708-11.
11. O'Donnell A, Premawardhena A, Arambepola M, Samaranayake R, Allen SJ, Peto TE, et al. Interaction of malaria with a common form of severe thalassemia in an Asian population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18716-21.
12. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Peto TE, Weatherall DJ, Gupta S, et al. Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait. *Nature genetics.* 2005;37(11):1253-7.

13. Blood: RBCs [Internet]. Available from:
<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes6%20Blood%20RBC.htm>.
14. Muncie HL, Campbell JS. Alpha and Beta Thalassemia. *American Family Physician*. 2009;80(4):339-44.
15. จินตนา ศิรินาวิน, ชนินทร์ ลิ้มวงศ์, พรพิมล เรืองวุฒิเลิศ, เสถียร สุขพนิชนันท์, วันชัย วนะชิวนาวิน, วรวรรณ ตันไพจิตร. ความรู้พื้นฐานธาลัสซีเมีย : เพื่อการป้องกันและควบคุมโรค. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน; 2547.
16. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*. 2001;2(4):245-55.
17. Ashley E, McGready R, Proux S, Nosten F. Malaria. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2006;4(3-4):159-73.
18. How Do People Get Thalassemia? [Internet]. Available from:
http://sickle.bwh.harvard.edu/thal_inheritance.html.
19. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:13.
20. แอลฟาธาลัสซีเมีย. Available from:
<http://medinfo2.psu.ac.th/pathology/Education/Thal/Alpha.html>.
21. Shawky RM, Kamal TM. Thalassemia intermedia: An overview. *Egypt J Med Hum Genet*. 2012.
22. รศ.พ.อ.นพ.กิตติ ต่อจรัส. ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb CS). มุลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย.
23. Lopez C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene*. 2010;467(1-2):1-12.
24. What Is Sickle Cell Anemia? [Internet]. Available from:
<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/sca/>.
25. Hemoglobin C [Internet]. 2004. Available from:
<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-HbC.pdf>.
26. การให้เลือดในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย [Internet]. Available from:
http://www.thalassemia.or.th/blood_trans.html.
27. Walker NF, Nadjm B, Whitty CJM. Malaria. *Medicine*. 2010;38(1):41-6.
28. Wernsdorfer WH. Global challenges of changing epidemiological patterns of malaria. *Acta Trop*. 2012;121(3):158-65.
29. Malaria [Internet]. 2010. Available from:
<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.
30. ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, ศรีวิชา ครุฑสูตร. รู้ทันโรคมมาลาเรีย. 2551.

31. ศรีวิชา ครุทสุตร, พลรัตน์ วิไลรัตน์, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ. มาลาเรีย. กรุงเทพมหานคร: ชนาเพรส จำกัด; 2549.
32. Abdalla SH, Corrah PT, Higgs DR. Alpha-thalassaemia in the Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83(3):420.
33. Willcox M, Bjorkman A, Brohult J. Falciparum malaria and beta-thalassaemia trait in northern Liberia. *Ann Trop Med Parasitol.* 1983;77(4):335-47.
34. Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S, N.Otchwemah R, Dietz E, D.Anemana S, et al. α^+ -thalassemia protects African children from severe malaria. *BLOOD.* 2004;104:2003-6.
35. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood.* 2000;95(1):360-2.
36. Makonkawkeyoon L, Sanguansermsri T, Asato T, Nakashima Y, Takei H. Rapid detection of chain termination mutations in the alpha 2 globin gene: *Blood.* 1993 Dec 1;82(11):3503-4.
37. 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(2):306-16.
38. Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British medical journal.* 1954;1(4857):290-4.
39. Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Alpers MP, Peto TE, Clegg JB, et al. alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14736-41.
40. Williams TN, Wambua S, Uyoga S, Macharia A, Mwacharo JK, Newton CR, et al. Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. *Blood.* 2005;106(1):368-71.
41. Qiu QW, Wu DD, Yu LH, Yan TZ, Zhang W, Li ZT, et al. Evidence of recent natural selection on the Southeast Asian deletion (--(SEA)) causing alpha-thalassemia in South China. *BMC Evol Biol.* 2013;13(63):1471-2148.
42. Than AM, Harano T, Harano K, Myint AA, Ogino T, Okada S. High incidence of 3-thalassemia, hemoglobin E, and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in populations of malaria-endemic southern Shan State, Myanmar. *Int J Hematol.* 2005;82(2):119-23.

43. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria journal*. 2010;9:13.
44. Anstey N, Russell B, Yeo T, Price R. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*. 2009;25:220 - 6.
45. Fairhurst RM, Bess CD, Krause MA. Abnormal PfEMP1/knob display on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing hemoglobin variants: fresh insights into malaria pathogenesis and protection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2012;14(10):851-62.
46. Hutagalung R, Wilairatana P, Looareesuwan S, Brittenham GM, Aikawa M, Gordeuk VR. Influence of hemoglobin E trait on the severity of Falciparum malaria. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(1):283-6.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาคผนวก ก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



COA No. 040/2013

IRB No. 459/55

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : ความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และความสัมพันธ์ทางคลินิกที่มีต่อผู้ป่วยโรคมะเร็งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : นางสาวสุภลักษณ์ พารา

สังกัดหน่วยงาน : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.


วิธีทบทวน : คณะกรรมการเต็มชุด

รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

เอกสารรับรอง :

1. โครงการวิจัย Version 3.0 Date 30 Dec 2012
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ Version 3.0 Date 30 Dec 2012
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 4.0 Date 10 Jan 2013
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย (กรณีผู้ให้ความยินยอมไม่สามารถอ่านหนังสือ หรือภาษาไทยได้) Version 4.0 Date 10 Jan 2013
5. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Date 3 Dec 2012
6. Curriculum Vitae
7. แบบสอบถาม Version 1.0 Date 3 Oct 2012

ลงนาม 
(ศาสตราจารย์กิตติคุณแพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์)
ประธาน
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

ลงนาม 
(รองศาสตราจารย์สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา)
กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการปฏิบัติหน้าที่แทนเลขานุการ
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

วันที่รับรอง : 22 มกราคม 2556

วันหมดอายุ : 21 มกราคม 2557

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)



COA No. 040/2013

IRB No. 459/55

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : Prevalence of alpha-thalassemia, HbE and their clinical correlation in malaria patients in Southeast Asia

Study Code : -

Principal Investigator : Miss Suparak Para


Study Center : Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Review Method : Full board


Continuing Report : At least once annually or submit the final report if finished.

Document Reviewed :

1. Protocol Version 3.0 Date 30 Dec 2012
2. Protocol Synopsis Version 3.0 Date 30 Dec 2012
3. Information sheet research participant Version 4.0 Date 10 Jan 2013
4. Informed Consent Form (If the consent can not be read. And language of Thailand.) Version 4.0 Date 10 Jan 2013
5. Consent Form Version 2.0 Date 3 Dec 2012
6. Curriculum Vitae
7. Questionnaire Version 1.0 Date 3 Oct 2012

Signature: 
 (Emeritus Professor Tada Sueblinvong MD)

Chairperson
The Institutional Review Board

Signature: 
 (Associate Professor Supeecha Wittayalertpanya)

Member and Assistant Secretary, Acting
Secretary The Institutional Review Board

Date of Approval : January 22, 2013

Approval Expire Date : January 21, 2014

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)



ภาคผนวก ข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ
 - 1.1. Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)
 - 1.2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ YCW-010 (GEMMYCO)
 - 1.3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง UB-10 (Ultra BASIC)
 - 1.4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
 - 1.5. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านค่าได้ 2 ตำแหน่ง SY-YOU2 (DENVER INSTRUMENT)
 - 1.6. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านค่าได้ 4 ตำแหน่ง PIONEER (OHAUS)
 - 1.7. Hemocue (Hemocue AB)
 - 1.8. เครื่องแยกสารพันธุกรรมแนวนอนขนาดเล็กแบบหน้าต่างพร้อมเครื่องจ่ายไฟแบบปรับค่าได้ IMR-001 Intelligent Electrophoresis Unit i-MyRun.N (MY-RUN)
 - 1.9. เครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้น Molecular Image[®] Gel Doc[™] XR+ with Image Lab[™] Software (BIO-RAD)
 - 1.10. MicrowaveR-250 Light up Dial (SHARP)
2. อุปกรณ์
 - 2.1. 0.2 ml ultra Amp PCR products PDR tubes (Sorenson, Bioscience)
 - 2.2. 0.65 ml Safesealmicrocentrifuge tube (Sorenson, Bioscience)
 - 2.3. 1.7 ml Safesealmicrocentrifuge tube (Sorenson, Bioscience)
 - 2.4. 2.0 ml Safesealmicrocentrifuge tube (Sorenson, Bioscience)
 - 2.5. 15 ml Centrifuge tube (CORNING)
 - 2.6. 50 ml Centrifuge tube (CORNING)
 - 2.7. 3 ml Pasteur pipette 10 ml
 - 2.8. Safety Cap Plain Tube 4 ml (VACUETTE)
 - 2.9. Disposable Syringe 10 ml

3. สารเคมี

- 3.1. Trisodium citrate (SIGMA-AIDRICH)
- 3.2. Citric acid (SIGMA)
- 3.3. Dextrose (Difco™ BD)
- 3.4. Sucrose Molecular Grade (USB)
- 3.5. Triton X-100 (SIGMA)
- 3.6. Magnesium choridehexahydrate (BIO BASIC INC)
- 3.7. Tris-Hydroxymethyl (Fisher Scientific)
- 3.8. Hydrocholic (J.T. BAKER)
- 3.9. Sucrose Molecular Grade (USB)
- 3.10. Magnesium choridehexahydrate (BIO BASIC INC)
- 3.11. Tris-Hydroxymethyl (Fisher Scientific)
- 3.12. Hydrocholic (J.T. BAKER)
- 3.13. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
(Plusone® Amersham Biosciences)
- 3.14. Sodium dodecyl sulphate (GE Healthcare)
- 3.15. Sodium hydroxide (MERCK)
- 3.16. Sodium chloride (UNIVAR)
- 3.17. Absolute ethanol (MERCK)
- 3.18. Isopropanol (Isopropyl alcohol) (MERCK)
- 3.19. Saturated Phenol (Amresco)
- 3.20. Chloroform (RCL labscan)
- 3.21. Calcium chloride (MERCK)
- 3.22. 50% Glycerol (MERCK)
- 3.23. 10 mMdNTP mix PCR Grade (invitrogen)
- 3.24. Platinum Taq DNA Polymerase (invitrogen)
- 3.25. Taq DNA Polymerase (invitrogen)

- 3.26. 10X PCR buffer (Invitrogen)
- 3.27. 50 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 3.28. 100 bp Sharp DNA marker (RBC Bioscience)
- 3.29. 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
- 3.30. Ethidium bromide solution (Promega)
- 3.31. *Tru1I* (*MseI*) (Fermentas)
- 3.32. *MnII* (Fermentas)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุภลักษณ์ พารา
วัน เดือน ปี เกิด	6 สิงหาคม 2531
เพศ	หญิง
สัญชาติ	ไทย
เชื้อชาติ	ไทย
ศาสนา	พุทธ
E-mail	mint_k_prachin@hotmail.com
ที่อยู่	1052 ถ.ปราจีนอนุสรณ์ ต.หน้าเมือง อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี 25000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY