

ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสและความหลากหลายทาง
พันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

นางสาวอภากร กาญจนวิทยากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์นี้ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

PREVALENCE OF G 6-PD DEFICIENCY AND GENETIC HETEROGENEITY
OF *G6PD* IN KAREN

Miss Arparkorn Kanchanavithayakul

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดร
จีเนสและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน G6PD ใน
ชาวกะเหรี่ยง

โดย

นางสาวอาภากร กาญจนวิทยากุล

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ชาลิส่า หลุยเจริญ ชีพสุนทร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐฐิ์ ประพันธ์วัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ชาลิส่า หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อิศรางค์ นุชประยูร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. อาคม ใสงาม)

อภากร กาญจนวิทยากุล : ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง. (Prevalence of G 6-PD deficiency and genetic heterogeneity of *G6PD* in Karen). อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร. ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร, 106 หน้า.

ภาวะพร่องเอนไซม์ *G 6-PD* เป็นความแปรผันของเอนไซม์ *G 6-PD* ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* บนโครโมโซมเพศ X โดยมีความจำเพาะกับชาติพันธุ์ การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี 2 ชนิด คือ *G6PD Viangchan* (871 G>A : Valine 291 Methionine) พบมากในชาวไทย ลาวและเขมร และ *G6PD Mahidol* (487 G>A : Glycine 163 Serine) พบมากในชาวพม่าและมอญ ปัจจุบันยังไม่มียางานการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปาเกะญอ ซึ่งเป็นชนกลุ่มใหญ่ในพม่าและเป็นชนกลุ่มน้อยที่อาศัยอยู่บริเวณชายแดนไทย-พม่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ *G 6-PD* การกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปาเกะญอ จังหวัดสุโขทัย จำนวน 230 คน (ชาย 106 คน หญิง 124 คน) ผลการศึกษาด้วยวิธี Fluorescence spot test พบภาวะพร่องเอนไซม์ *G 6-PD* ร้อยละ 8.7 โดยแบ่งเป็นเพศชายร้อยละ 14.15 และเพศหญิงร้อยละ 4.03 ขณะที่กลุ่ม Intermediate พบร้อยละ 11.74 แบ่งเป็นเพศชายร้อยละ 7.55 และเพศหญิงร้อยละ 15.32 เมื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในประชากรเพศชายพบ *G6PD Mahidol* ร้อยละ 14.15 (15 ใน 106 คน) และ *G6PD Canton* ร้อยละ 0.94 (1 ใน 106 คน) จากการศึกษาพหุสัณฐาน SNPs nt1,311C→T และ nt93T→C ในอัลลีลปกติ (*G6PD B*) พบรูปแบบ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T มากที่สุดร้อยละ 75.33 (226 ใน 300 อัลลีล) ขณะที่อัลลีล *G6PD Mahidol* และ *G6PD Canton* ทั้งหมดพบ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T ดังนั้นงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า ภาวะพร่องเอนไซม์ *G 6-PD* ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปาเกะญอ พบได้มากเช่นเดียวกับชาติพันธุ์อื่นๆ ในภูมิภาคนี้ที่ซึ่งมีมาลาเรียระบาด อีกทั้งพบ *G6PD Mahidol* และ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T มากที่สุดเช่นเดียวกับชาวพม่าและมอญ ซึ่งแตกต่างจากชาวไทย ลาวและเขมร ดังนั้นการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แสดงให้เห็นว่าชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปาเกะญอ น่าจะสืบเชื้อสายชาติพันธุ์ร่วมกับชาวพม่าและมอญ โดยมี *G6PD B* haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T เป็นอัลลีลบรรพบุรุษ

ภาควิชา...ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิติ.....
 สาขาวิชา...ชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2554.....

5374671030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY / G6PD MAHIDOL / G6PD VIANGCHAN / KAREN POPULATION

ARPARKORN KANCHANAVITHAYAKUL : PREVALENCE OF G 6-PD DEFICIENCY AND GENETIC HETEROGENEITY OF *G6PD* IN KAREN. ADVISOR : CHALISA LOUICHAROEN CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 106 pp.

Mutations in the *G6PD* gene can lead to G 6-PD deficiency, which specific in many ethnic groups. In Southeast Asia, there are two common *G6PD* mutations, which are G6PD Viangchan^{871A} and G6PD Mahidol^{487A}. G6PD Viangchan (871G>A : Valine 291 Methionine) was the most common in Thai, Lao and Cambodian. G6PD Mahidol (487 G>A : Glycine 163 Serine) was the most common in Burmese and Mon. To date, there has been no report of G 6-PD deficiency and its molecular genetics in Karen, an ethnic group found mostly in Myanmar and a minority tribe on the Thai-Myanmar border. This research, we collected 230 Karen (*Pwar Kar Nyaw*) blood samples (male 106, female 124) to study the prevalence of G 6-PD deficiency and the *G6PD* mutations.

Fluorescence spot test showed 20 G 6-PD deficient (male 14.15%, female 4.03%) and 27 intermediates (male 7.55%, female 15.32%). Molecular analysis was performed in 106 male to identify *G6PD* mutations. Eight *G6PD* mutations were characterized : G6PD Mahidol (14.15 %) was the most dominant mutation followed by G6PD Canton (0.94%). The exon11 nt1,311C→T and IVS11 nt93T→C haplotypes were characterized in all 230 Karen individuals (353 alleles). Haplotype 1,311C, 93T was the most common haplotype in G6PD B (75.33%). All G6PD Mahidol and G6PD Canton alleles were haplotype 1,311C, 93T. Therefore, we found highly prevalence of G 6-PD deficiency in Karen as many ethnic groups who live in Southeast Asia. All G6PD Mahidol alleles shared the same haplotype (1,311C, 93T), as has been previously reported in G6PD Mahidol in Burmese and Mon. Our study suggests that Karen share a common ancestry with Burmese and Mon.

Department : ...Biochemistry..... Student's Signature

Field of Study : ...Medical Biochemistry..... Advisor's Signature

Academic Year : ...2011.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขจุดบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐฐิติ ประพันธ์วัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อิศรางค์ นุชประยูร และ อาจารย์ ดร. อาคม ใสงาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ ประสาทวิชาความรู้ ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ดร. เยาวรีย์ กิตติกัลยาวงศ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความรู้และเอื้อเฟื้อสถานที่ และวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แพทย์หญิง ฝนทิพ แจ่มแสง และนางสาวนันทพร อังศุวิทยา ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในการทำวิจัย และนางสาวกาญจนาวดี ประสิทธิ์ธิดา ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ 828 ตึกแพทยพัฒน์ ชั้น 8 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ทูนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สกว.

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะแล้วเสร็จไม่ได้หากไม่ได้รับโอกาสและสนับสนุนทางการศึกษาจาก บิดา มารดา และกำลังใจที่สำคัญจากทุกคนในครอบครัว ซึ่งประโยชน์และความรู้ของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านและผู้ที่สามารถนำงานวิจัยนี้ไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฅ
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 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส.....	6
2.2 โครงสร้างของเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส.....	8
2.3 ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส.....	11
2.3.1 อาการทางคลินิก.....	13
2.3.1.1 ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก.....	13
2.3.1.2 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการกินถั่วปากอ้า.....	14

2.3.1.3 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการบริโภคยาบางชนิด.....	15
2.3.1.4 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันที่เกิดจากการติดเชื้อ.....	17
2.3.1.5 ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลม	18
2.4 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD	19
2.4.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในประชากรโลก.....	19
2.4.2 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้.....	20
2.5 ความสัมพันธ์ของมัลลาเรียและภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD	21
2.6 การตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD	21
2.7 พันธุศาสตร์ของยีนสร้างเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส.....	22
2.8 ชาติพันธุ์กะเหรี่ยง.....	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
3.1 ประชากรที่ใช้ในการวิจัย.....	37
3.1.1 ประชากร.....	37
3.1.2 ขนาดตัวอย่าง.....	37
3.2 การเก็บตัวอย่าง.....	37
3.2.1 การสัมภาษณ์กลุ่มประชากร.....	37
3.2.2 การเก็บตัวอย่างเลือด.....	38
3.3 การคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PDเชิงคุณภาพวิเคราะห์ โดยใช้ G 6-PD Test Kit (Fluorescence spot test).....	38
3.4 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol chloroform.....	39
3.5 การศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน G6PD ด้วยวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).....	40
3.5.1 ขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR).....	40
3.5.2 ขั้นตอน Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	42
3.5.3 Gel electrophoresis.....	43

3.6 การศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>G6PD</i> ด้วยวิธี	
Direct Sequencing.....	44
3.6.1 ขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR).....	44
3.6.2 Gel electrophoresis.....	46
3.6.3 การทำ PCR Product และ Gel fragments ให้บริสุทธิ์ โดยใช้HiYield	
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	47
3.6.3.1 การทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์... ..	47
3.6.3.2 การทำ Gel fragments ให้บริสุทธิ์.....	47
3.6.4 การวิเคราะห์ผล DNA Sequencing.....	48
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	48
3.7.1 วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไป.....	48
3.7.2 วิเคราะห์ข้อมูลฟีโนไทป์.....	48
3.7.3 วิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์.....	48
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	49
4.1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา.....	49
4.2 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6PD ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ.....	50
4.3 การกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ในกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ.....	51
4.3.1 การกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> จากการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP.....	51
4.3.2 การกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> จากการศึกษาด้วยวิธี Direct sequencing....	59
4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>G6PD</i>	60
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	64
5.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ.....	64
5.2 การกลายพันธุ์และความหลากหลายของพันธุกรรมของยีน <i>G6PD</i> ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่ม	
ปากะญอ.....	66
รายการอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก.....	81

	ญ
	หน้า
ภาคผนวก ก.....	82
ภาคผนวก ข.....	96
ภาคผนวก ค.....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	กลุ่มความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD ที่สัมพันธ์กับอาการทางคลินิก.....	12
2.2	ชื่อยาและสารเคมีที่อาจทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่ายในผู้พร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	17
2.3	ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G -6PD ในชาติพันธุ์ต่างๆ.....	20
2.4	ข้อมูลดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนของยีน <i>G6PD</i>	25
2.5	ชนิดการกลายพันธุ์ ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของยีน <i>G6PD</i> ในเชื้อชาติต่างๆ.....	32
2.6	บริเวณที่พบโพลิมอร์ฟิซึมของยีน <i>G6PD</i> ทั้ง 6 ตำแหน่ง และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ตรวจสอบ.....	33
2.7	ภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>G6PD</i> บริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,311 และ 93 ในคนปกติ คนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ชนิดเวียงจันทร์ แจมมู และมหิดล.....	34
3.1	Primer และ Annealing temperature ที่ใช้ในการทำ PCR แต่ละชนิด.....	42
3.2	ชนิดของ Restriction enzymes ชนิดของ Buffer ตำแหน่งเบสที่ตัดและ Product size ที่ตัดได้ รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ RFLP.....	43
3.3	ความเข้มข้นสุดท้ายของ Master Mix ในการทำ PCR แต่ละ exon.....	45
3.4	สภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ของแต่ละ exon.....	45
3.5	Primer และ Product size ของแต่ละ exon.....	46
4.1	ผลการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยใช้ Fluorescence spot test ในตัวอย่างทั้งหมด และกลุ่ม Unrelated individual.....	51
4.2	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ทั้ง 8 ชนิดด้วยวิธี PCR-RFLP ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 47 ตัวอย่าง.....	57
4.3	การกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ที่พบในกลุ่ม Unrelated individual.....	58
4.4	การกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ที่พบในประชากรเพศชาย 106 คน.....	58
4.5	Genotype frequency และ Allele frequency ทั้งในเพศหญิงและเพศชายในกลุ่มตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ชนิด <i>G6PD Mahidol</i> ^{487A} และ <i>G6PD Canton</i> ^{1,376T}	59

ตารางที่	หน้า
4.6	61
Genotype frequency และ Allele frequency ของ SNPs nt1,311C→T และ nt93→C ทั้งเพศหญิงและชาย ในชาวกะเหรี่ยงป่ากะญอ.....	
4.7	63
Haplotype ของอัลลีลต่างๆบนยีน <i>G6PD</i> ในกะเหรี่ยงกลุ่มป่ากะญอ.....	

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	บทบาทของเอนไซม์ G 6-PD ต่อการสร้าง NADPH และบทบาทของกลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์ (GSH) ในการป้องกันเซลล์จากพิษของออกซิเจน.....	7
2.2	โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ G 6-PD ในรูปไดเมอร์.....	9
2.3	โครงสร้างของเอนไซม์ G 6-PD รูปแบบเตตราเมอร์ในมนุษย์.....	10
2.4	ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	12
2.5	ต้นของถั่วปากอ้า (ข้าว) และเมล็ดถั่วปากอ้าแบบปรั่งสุกและแบบดิบ (ขวา)....	15
2.6	โครงสร้างทางเคมีของสารวิซีน (ข้าว) และคอนวิซีน (ขวา).....	15
2.7	การเปรียบเทียบปัสสาวะปกติ (ข้าว) และปัสสาวะที่มีฮีโมโกลบิน (ขวา).....	15
2.8	ผลการตรวจแผ่นฟิล์มเลือดของผู้พร่องเอนไซม์ G 6-PD ซึ่งมีภาวะโลหิตจางเฉียบพลันหลังจากบริโภคยาแก้ปวดชื่อ พาราเซตามอล.....	16
2.9	ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลม (chronic nonspherocytic hemolytic anemia: CNSHA).....	18
2.10	การกระจายตัวและความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในประชากรทั่วโลก.....	19
2.11	ตำแหน่งของยีน <i>G6PD</i> บนโครโมโซมเพศ X บริเวณ Xq28.....	23
2.12	แผนภาพของยีน <i>G6PD</i> ในมนุษย์.....	23
2.13	การกลายพันธุ์แบบ point mutation ที่เกิดขึ้นในบริเวณ coding region ของยีน <i>G6PD</i>	27
2.14	รูปแบบและชนิดการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนแอกซอนที่ 2-13 ของยีน <i>G6PD</i>	28
2.15	ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และชนิดการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ในภูมิภาคต่างๆทั่วโลก.....	29
2.16	รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ที่พบบ่อยในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้....	30
2.17	ตำแหน่งของโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆในยีน <i>G6PD</i>	31
2.18	แผนที่ประเทศพม่าบริเวณที่มีการอาศัยของชาวกะเหรี่ยง.....	35
3.1	ปฏิกิริยาการเกิด NADPH ในเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	38

ภาพที่	หน้า	
3.2	สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR สำหรับศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> แต่ละชนิด.....	39
4.1	ชุดพื้นเมืองของชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ.....	49
4.2	การเก็บตัวอย่างเลือดของชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ.....	50
4.3	ผลการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ด้วยวิธี Fluorescence spot test.....	50
4.4	การตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ^{487A} ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	52
4.5	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan ^{817A} ด้วยวิธี PCR-RFLP....	52
4.6	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Union ^{1,360T} ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	53
4.7	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton ^{1,376T} ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	54
4.8	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping ^{1,388A} ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	54
4.9	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-4 ^{392T} ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	55
4.10	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Coimbra ^{592T} ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	56
4.11	ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-5 ^{1,024T} ด้วยวิธี PCR-RFLP....	56
4.12	Chromatogram ของ SNP nt1,311 C → T ใน exon 11.....	60
4.13	Chromatogram ของ SNP nt93 C →T ใน IVS 11.....	60
4.14	ผลการตรวจสอบ SNP nt1,311 C → T ของยีน <i>G6PD</i> ด้วยวิธี PCR-RFLP....	62
4.15	ผลการตรวจสอบ SNP nt93 C →T ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	degree Celsius
µl	microlitre
µmol	micromole
3'-UTR	3' untranslated region
5'-UTR	5' untranslated region
6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase
ACD	acid citrate dextrose
AHA	acute hemolytic anemia
bp	base pair
Cat	catalase
cm	centimeter
CMV	cytomegalovirus
CNSHA	chronic non-spherocytic hemolytic anemia
D	deficiency
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
Fe ²⁺	ferric
Fe ³⁺	ferrous
g	gram
G 6-P	glucose-6-phosphate
G 6-PD	glucose 6-phosphate dehydrogenase
g/dl	gram/deciliter
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	reduced glutathione

GSSG	oxidized glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
Hb	hemoglobin
HMS	hexose monophosphate shunt
I	Intermediate
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
IU/g Hb ₂	International unit/gram hemoglobin
kb	kilo base pair
kDa	kilo dalton
M	molar
MIM	Mendelian Inheritance in Man
ml	millilitre
mM	millimolar
mmol/L	millimole/litre
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Methemoglobin Reduction Test
n	number
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
ng	nanogram
ng/μl	nano gram/microlitre
nm	nanometer
Nt	nucleotide
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism
PMN	polymorphonuclear leukocyte
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute

S.D.	standard deviation
SNPs	single nucleotide polymorphism
STR	short tandem repeats
TCF	temperature correction factor
U	unit
UV	ultraviolet

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (NADPH) ในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ที่ช่วยรักษาสสมดุลของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของเซลล์ (1) ดังนั้นภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (G 6-PD deficiency) จึงทำให้เกิดภาวะโลหิตจางจากการที่เม็ดเลือดแดงแตกง่าย (acute hemolytic anemia) ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD พบได้บ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยชาวไทยมีความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ร้อยละ 11.1 ในเพศชาย และร้อยละ 5.8 ในเพศหญิง จากการที่พบภาวะพร่องเอนไซม์มากในบริเวณมาลาเรียระบาด (2) จึงมีข้อสันนิษฐานว่าโรคมาลาเรียหรือโรคติดเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ซึ่งมีความรุนแรงเป็นตัวผลักดันให้จีโนมของมนุษย์มีวิวัฒนาการในการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เพื่อให้ร่างกายสามารถป้องกันหรือลดความรุนแรงของเชื้อพลาสโมเดียม ตัวอย่างของวิวัฒนาการของจีโนม เช่น การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่ก่อให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (3)

การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* มีลักษณะการถ่ายทอดแบบ X-linked recessive (4) จึงพบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง อีกทั้งรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* จะมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ ซึ่งคุณลักษณะดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของชาติพันธุ์ อาทิเช่น ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีความหลากหลายทางเชื้อชาติ ภาษาและวัฒนธรรม พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อย 2 ชนิด คือ ชนิดเวียงจันทน์ (*G6PD* Viangchan : 871G→A : Valine 291 Methionine) ซึ่งพบมากในชาวไทย (5) ลาว (6) และเขมร (7) และชนิดมหิดล (*G6PD* Mahidol : 487G→A : Glycine 163 Serine) ที่พบมากในชาวพม่า (4, 8) และมอญ (4) จึงมีการแบ่งกลุ่มบรรพบุรุษของประชากรในบริเวณนี้ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มชาวพม่า และมอญซึ่งอยู่ทางตะวันตกของคาบสมุทรอินโดจีนที่มักพบการกลายพันธุ์ชนิดมหิดล (6) และกลุ่มชาวไทย ลาว และเขมรที่อยู่บริเวณศูนย์กลางและค่อนไปทางตะวันออกของคาบสมุทรที่มักพบการกลายพันธุ์ชนิดเวียงจันทน์ แต่อย่างไรก็ตามยังมีชาติพันธุ์อื่นๆ เช่น กะเหรี่ยงที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคนี้โดยที่ยังไม่มีการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากร เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชาวกะเหรี่ยงกับกลุ่มประชากรอื่นๆ ในบริเวณดังกล่าว

ชาวกะเหรี่ยงเป็นชนกลุ่มใหญ่ในประเทศพม่าและเป็นชนกลุ่มน้อยที่อพยพมาอาศัยอยู่ในประเทศไทยกว่า 300,000 คน (9) กะเหรี่ยงมีหลายเผ่าพันธุ์ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ (9) ได้แก่ กะเหรี่ยงสะกอ (Skaw Karen) หรือที่เรียกตัวเองว่า ปากะญอ (*Pwar Kar Nyaw*) กะเหรี่ยงโปว์ (Pwo Karen, *Ploe*) เป็นกะเหรี่ยงที่พบมากเป็นอันดับสอง กะเหรี่ยงบะเว (Bwe Karen, *Bway*) และกะเหรี่ยงปะโอ (Pa-O) หรือที่เรียกตัวเองว่า ตองสู ชาวกะเหรี่ยงมีลักษณะสังคมปิดที่ไม่ค่อยติดต่อกับชนพันธุ์อื่นๆ มีเอกลักษณ์ทางด้านศิลปะและวัฒนธรรมที่โดดเด่นเป็นของตนเอง ใช้ภาษากะเหรี่ยงซึ่งจัดอยู่ในตระกูลจีน-ทิเบตเป็นภาษาหลัก การแต่งกายของกะเหรี่ยงแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะที่จำเพาะและแตกต่างกัน นอกจากนี้ในกะเหรี่ยงกลุ่มเดียวกันที่อาศัยอยู่คนละพื้นที่ก็ยังมีการแต่งกายที่แตกต่างกันด้วย เมื่อดูจากลักษณะทางกายภาพพบว่า ชาวกะเหรี่ยงมีลักษณะโครงหน้าคล้ายคลึงกับคนจีนและทิเบต (10) จึงมีการตั้งข้อสันนิษฐานว่า ชาวกะเหรี่ยงน่าจะมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ทิเบตหรือประเทศจีน (11) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาหรือหลักฐานใดที่จะสรุปข้อสันนิษฐานดังกล่าว ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ โดยผ่านการศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD การกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชาติพันธุ์กะเหรี่ยง ชาวจีนและชาติพันธุ์อื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

1.2 คำถามของงานวิจัย

1.2.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสในชาวกะเหรี่ยงเป็นอย่างไร

1.2.2 การกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยงเป็นอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสในชาวกะเหรี่ยง

1.3.2 เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

1.4 สมมติฐาน

1.4.1 พบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงในปริมาณสูง (ประมาณร้อยละ 10)

1.4.2 พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ในชาวกะเหรี่ยงได้มากที่สุด โดยมีลักษณะ haplotype เป็น 1,311C, 93T

1.5 คำสำคัญ

Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD Mahidol, G6PD Viangchan, Karen population

1.6 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive research)

1.7 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชาติพันธุ์ของชาวกะเหรี่ยงชาวจีน และชาติพันธุ์อื่นๆในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยอาศัยการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD การกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

G6PD Mahidol เป็นการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในบริเวณ exon ที่ 6 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 487 มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก G เป็น A ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 163 เปลี่ยนจาก Glycine เป็น Serine อาการทางคลินิกจัดอยู่ในประเภทที่ 3 เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในชาวพม่าและมอญ

G6PD Viangchan เป็นการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในบริเวณ exon ที่ 9 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 871 มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก G เป็น A ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 291 เปลี่ยนจาก Valine เป็น Methionine อาการทางคลินิกจัดอยู่ในประเภทที่ 2 เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในชาวไทย ลาวและเขมร

Haplotype คือ ภาวะพหุฐานฐานหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่วิเคราะห์หลายตำแหน่งร่วมกันเป็นชุด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส

เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase) หรือ G 6-PD เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและพบได้ทุกเซลล์ (housekeeping enzyme) ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เซลล์โปรคาริโอต ยีสต์ โปรโตซัว พืช และสัตว์ (12-13) ถึงแม้เอนไซม์ G 6-PD จะสามารถพบได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย แต่ปริมาณและความเข้มข้นของเอนไซม์ G 6-PD ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ (14-16) ในมนุษย์เอนไซม์ G 6-PD ถูกสร้างจากยีน *G6PD* ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ X ส่วนปลายตำแหน่ง Xq28 (17) มีรหัสเอนไซม์สากล คือ EC 1.1.1.49 (18-19) โดยในฐานข้อมูล Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) ระบุให้เอนไซม์ G 6-PD มีรหัสสากลคือ MIM 305900 (4, 7, 20) เอนไซม์ G 6-PD มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากภาวะเครียด (oxidative stress) ที่เกิดจากพิษของสารประกอบออกซิเจน (15) ด้วยสาเหตุต่างๆ ดังนี้

1. เซลล์เม็ดเลือดแดงมีหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนให้เซลล์ต่างๆทั่วร่างกาย จึงมีโอกาสได้รับพิษจากออกซิเจนมากกว่าเซลล์ชนิดอื่น ความเป็นพิษของสารประกอบออกซิเจนที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินจะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) (21) ที่ไม่สามารถนำพาออกซิเจนได้

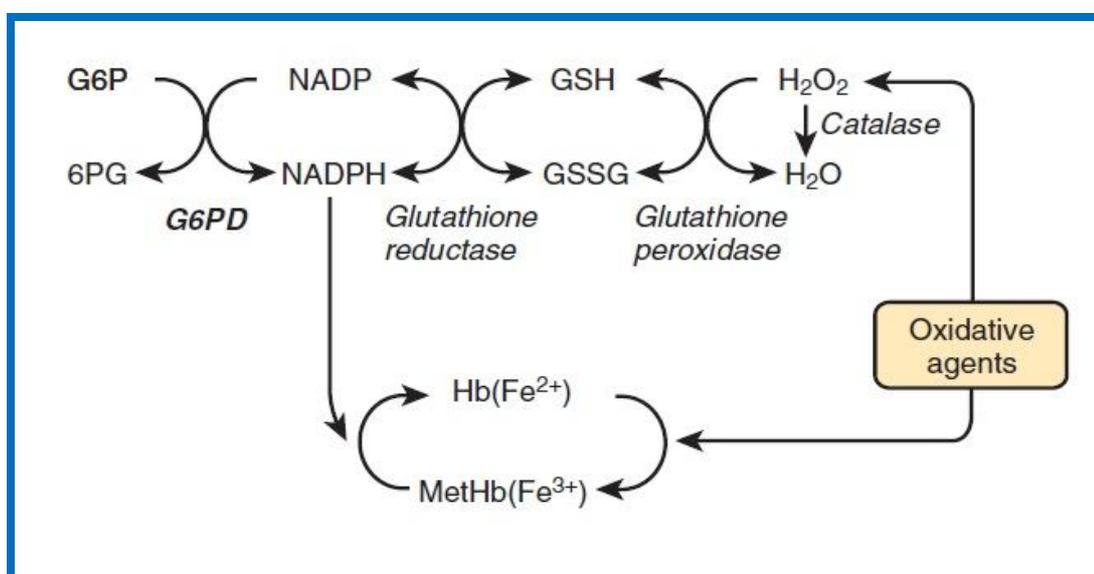
2. เมื่อมีการติดเชื้อในร่างกายจะมีการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล (granule) ออกมาทำลายเชื้อโรคเป็นจำนวนมาก เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะหลั่งเอนไซม์และสารอนุมูลอิสระมาทำลายเชื้อโรค ทำให้เม็ดเลือดแดงที่อยู่บริเวณใกล้เคียงถูกทำลาย (22)

จากเหตุผลที่กล่าวมาประกอบกับลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญวัย (mature) เป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส (nucleus) และไม่โทคอนเดรีย (mitochondria) ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดแดงจึงต้องอาศัยวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway, PPP) หรือเฮกโซสมอนอโนฟอสเฟตซันต์ (hexose monophosphate shunt, HMS) เพียงแหล่งเดียวที่สร้างนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (NADPH) ซึ่งเป็นโคเอนไซม์สำคัญที่ช่วยรักษาสมดุลของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และรีดักชัน (reduction) ของเซลล์ (23) ดังนั้นเซลล์ที่จะอยู่รอดได้จำเป็นต้องมีปริมาณ NADPH ให้เพียงพอ เพื่อป้องกันโมเลกุลและโปรตีนต่างๆภายในเซลล์จากพิษของออกซิเจน

เอนไซม์ G 6-PD มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคส และเป็นเอนไซม์ลำดับแรกในวิถีเพนโทสฟอสเฟตหรือเฮกโซสมอนอโนฟอสเฟตซันต์ที่ควบคุมการทำงาน

ทั้งหมด (rate-limiting step) (24) โดยเปลี่ยนกลูโคส 6-ฟอสเฟต (glucose 6-phosphate, G 6-P) ให้เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคนेट (6-phosphogluconate) ปฏิกริยานี้จะเกิดร่วมกับปฏิกริยารีดักชันของ นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) สร้างเป็นนิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ซึ่ง NADPH ที่เกิดขึ้นจะให้โปรตอนแก่เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเทส (glutathione reductase) และเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ในการป้องกันการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากสภาวะเครียด (oxidative stress)

เอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเทสจะเปลี่ยนกลูตาไธโอนในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) ให้เป็นกลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์ (GSH) จากนั้น GSH จะทำงานร่วมกับเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ในการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ นอกจากนี้ความสำคัญของ NADPH ต่อการป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแดงมิให้แตกจากสภาวะเครียดและพิษของออกซิเจน NADPH ยังจำเป็นต่อการสร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น กรดไขมัน และคอเลสเตอรอล



ภาพที่ 2.1 แสดงบทบาทของเอนไซม์ G 6-PD ต่อการสร้าง NADPH และบทบาทของกลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์ (GSH) ในการป้องกันเซลล์จากพิษของออกซิเจน (25) G 6-P = กลูโคส 6-ฟอสเฟต (glucose 6-phosphate) 6-PG = 6-ฟอสโฟกลูโคนेट (6-phosphogluconate) G 6-PD = เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase) NADP = นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate) NADPH = นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) GSH = กลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione) GSSG = กลูตาไธโอนในรูปออกซิไดซ์ (oxidized glutathione) H_2O_2 = ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) Hb (Fe^{2+}) = ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) MetHb (Fe^{3+}) = เมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin)

2.2 โครงสร้างของเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส

การทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ในร่างกายมักทำงานได้ 2 รูปแบบ คือ คู่ไดเมอร์ (dimer) ที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 โมเลกุล หรือรูปแบบที่เป็นเตตราเมอร์ (tetramer) ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของโมเลกุลทั้งหมด 4 โมเลกุล (16, 25-26) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD มีหลายปัจจัยได้แก่

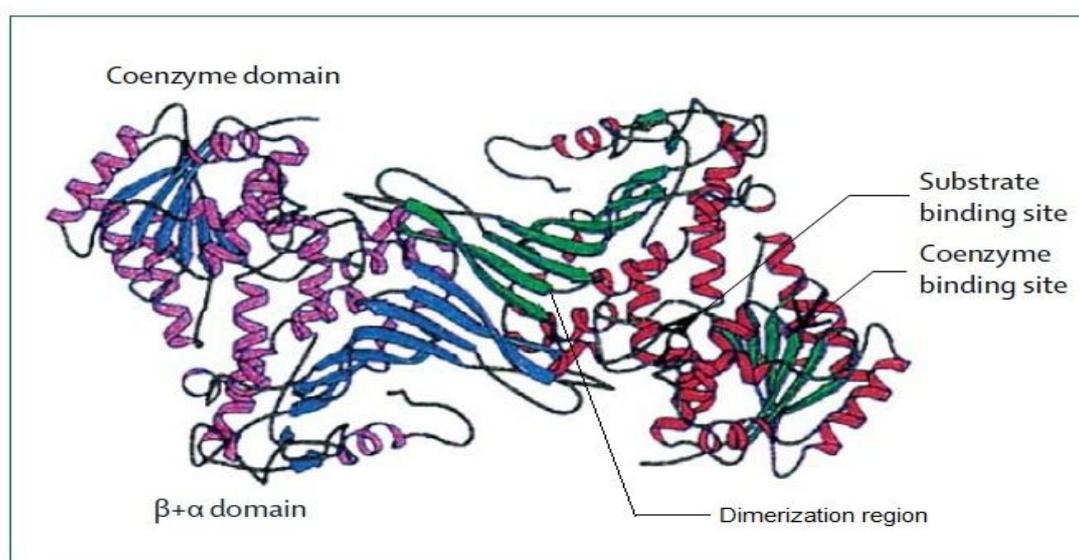
1. ความเป็นกรดและด่างภายในร่างกายจะเป็นตัวกำหนดรูปแบบการรวมตัวของเอนไซม์ G 6-PD โดยที่ถ้ามีค่าพีเอช (pH) และค่า Ionic strength สูง เช่น ค่าพีเอชมากกว่า 8 เอนไซม์ G 6-PD มักทำงานในรูปแบบไดเมอร์ และ ถ้าค่าพีเอชและค่า Ionic strength ต่ำ เช่น ค่าพีเอชต่ำกว่า 6 เอนไซม์ G 6-PD มักทำงานในรูปแบบของเตตราเมอร์ นอกจากนี้สภาวะที่ค่าพีเอชมีค่าสูงมากๆ จะทำให้เอนไซม์ G 6-PD อยู่ในรูปมอนอเมอร์ที่ไม่สามารถทำงานได้ (26-27)
2. การทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่าง $NADP^+$ และ NADPH โดยเอนไซม์ G 6-PD จะหยุดทำงานเมื่อจำนวน NADPH มีมากกว่า NADP (28)
3. สภาวะที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 0-2 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์ G 6-PD ไม่สามารถทำงานได้ (18)
4. สภาวะที่ไม่มีโมเลกุลของ $NADP^+$ จะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ G 6-PD แยกออกจากกันและไม่สามารถทำงานได้ (18) เนื่องจากบริเวณผิวของ $NADP^+$ ที่อยู่ใน $\beta+\alpha$ domain มีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และชอบน้ำ (Hydrophilic) อย่างละ 50 % ซึ่งบริเวณที่ชอบน้ำมีประจุบวก ส่งผลให้โมเลกุลของ $NADP^+$ สร้างพันธะไฮโดรเจนยึดบริเวณ β sheet และ C-terminus ของแต่ละ subunit เข้าด้วยกัน ทำให้เกิดการรวมตัวของโมเลกุลเอนไซม์ G 6-PD ขึ้น

โมเลกุลที่ประกอบกันเป็นกลุ่มของไดเมอร์และเตตราเมอร์แต่ละโมเลกุลเรียกว่ามอนอเมอร์ (monomer) ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 515 ตัว มีน้ำหนักประมาณ 59 กิโลดาลตัน (29) ซึ่งแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยโดเมนที่สำคัญ 2 โดเมน ได้แก่

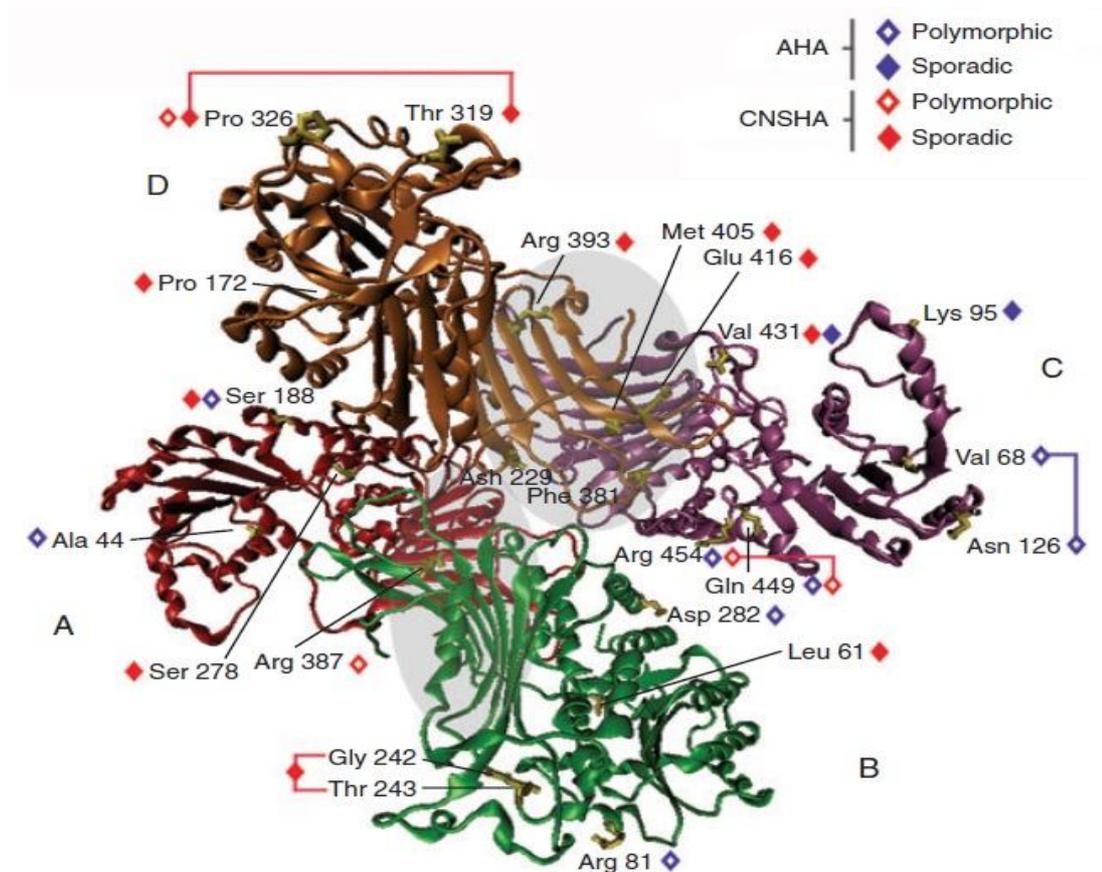
1. N-terminal domain ครอบคลุมตั้งแต่กรดอะมิโนตัวที่ 27-200 โดยที่กรดอะมิโนตัวที่ 38-44 มีลำดับคือ GxxGDLx เป็นส่วนของ Coenzyme binding site (NADP⁺) (16, 24, 30)
2. $\beta+\alpha$ domain มีขนาดใหญ่กว่า N-terminal domain ครอบคลุมกรดอะมิโนตัวที่ 199-515 โดยที่กรดอะมิโนตัวที่ 198-205 มีลำดับคือ RIDHYLGK เป็นส่วนของ G 6-P binding site (31) และกรดอะมิโนตัวที่ 380-425 เป็น antiparalle beta sheet ทั้งหมด 9 สาย ซึ่งโดเมนทั้ง 2 เชื่อมกันด้วย α -helix

ในปีคริสต์ศักราช 1996 มีการค้นพบโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ G 6-PD ในมนุษย์เป็นครั้งแรกซึ่งเป็นโครงสร้างของเอนไซม์ G 6-PD ชนิดแคนตัน (G6PD Canton : 1,376G \rightarrow T : Arginine 459 Leucine) โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยสนามแม่เหล็ก (nuclear magnetic resonance spectroscopy) (32) รูปแบบการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ชนิดแคนตันที่ศึกษาเป็นลักษณะของเตตราเมอร์ (24)

โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ G 6-PD ที่ทำงานในรูปแบบของไดเมอร์และเตตราเมอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2.2 และ 2.3



ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ G 6-PD ในรูปไดเมอร์ (16)



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ G 6-PD รูปแบบเตตราเมอร์ในมนุษย์ (33) A-D แสดงมอนอเมอร์ทั้ง 4 โมเลกุลของเอนไซม์ G 6-PD บริเวณสีเทาของแต่ละโดเมนแสดงถึงบริเวณที่มอนอเมอร์แต่ละโมเลกุลมาจับกันเป็นไดเมอร์ บริเวณนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 57 ตัว การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่เกิดขึ้นในบริเวณที่มีการจับคู่เป็นไดเมอร์ เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ซึ่งทำให้เกิดอาการทางคลินิก คือ ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลม (chronic non-spherocytic hemolytic anemia : CNSHA) เช่น G6PD Plymouth (488G→A : Glycine 163 Asparagine) G6PD Tsukui (561-563 deletion : Serine 188 deletion) และ G6PD Sumare (1,292T→G : Valine 431 Glycine) เป็นต้น และภาวะโลหิตจางเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia : AHA) เช่น G6PD Surabaya (1,291G→A : Valine 431 Methionine) เป็นต้น

2.3 ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส

ในปีคริสต์ศักราช 1956 มีการค้นพบภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency) เป็นครั้งแรก (34) ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เป็นความผิดปกติของเอนไซม์ในเม็ดเลือดแดงที่พบได้บ่อยในประชากรทั่วโลก ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* บนโครโมโซมเพศ X ทำให้เกิดเป็นความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD รูปแบบต่างๆ

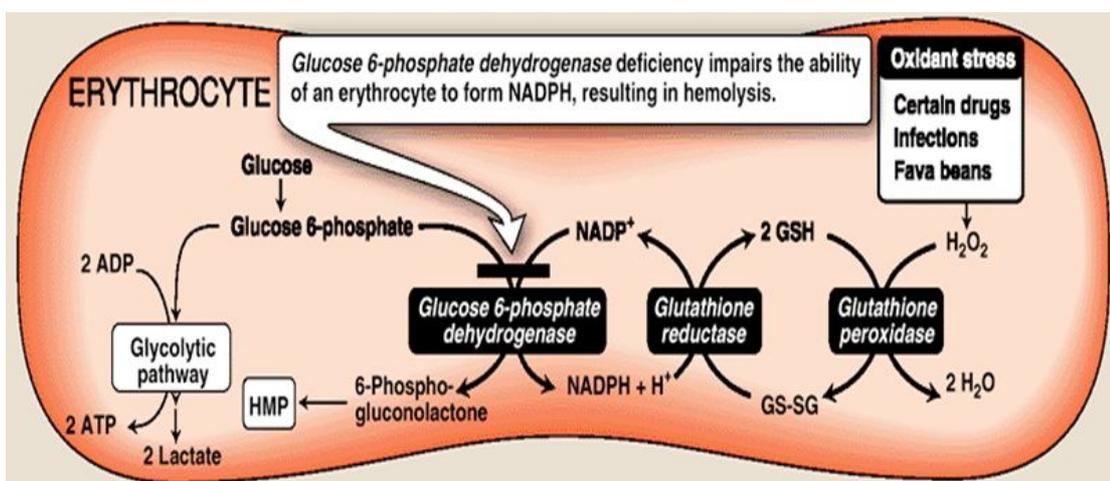
ภาวะความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD มิได้หมายถึง การขาดเอนไซม์ G 6-PD แต่เป็นภาวะที่เอนไซม์ G 6-PD มีความผิดปกติแล้วส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์มีความผิดปกติหรือแตกต่างจากคนทั่วไป (18) จากการศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในอดีตจนถึงปัจจุบันพบความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD มากกว่า 400 ชนิด (35) ซึ่งความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD ประมาณร้อยละ 65 มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่ปกติหรือใกล้เคียงปกติ (32) ตัวอย่างเช่น *G6PD A* เป็นความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD ที่ค้นพบเป็นครั้งแรก ต่อมามีความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD ที่คล้ายคลึงกับ *G6PD A* เรียกว่า *G6PD A'* ขณะที่เอนไซม์ G 6-PD ที่ปกติ (wild type) หรือไม่มีความแปรผันของเอนไซม์ถูกเรียกว่า *G6PD B* (16, 36) การจำแนกความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD รูปแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับการศึกษา (16, 30) เช่น enzyme activity, electrophoretic mobility, physicochemical (thermostability และ chromatographic), kinetic (ความเข้มข้นของสับสเตรท, K_m ของกลูโคส 6-ฟอสเฟต หรือ NADPH) และ ค่า pH

จากการที่ความผันแปรของเอนไซม์ G 6-PD มีอยู่หลากหลาย องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) จึงได้แบ่งกลุ่มความแปรผันของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ออกเป็น 5 กลุ่ม ตามค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD และอาการทางคลินิก (30, 37) แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงกลุ่มความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD ที่สัมพันธ์กับอาการทางคลินิก

Class	Enzyme Activity	Clinical Manifestation
I	Severely deficient ($<1\%$ or not detectable)	Chronic non-spherocytic hemolytic anemia (CNSHA)
II	Severely deficient (1-10% residual activity)	Acute hemolytic anemia
III	Moderately deficient (10-60% residual activity)	Occasionally acute hemolytic anemia
IV	Normal activity (60-150 %)	Asymptomatic
V	Increased activity ($>150\%$)	Asymptomatic

เมื่อร่างกายเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD การสร้าง NADPH จะน้อยกว่าปกติประกอบกับเมื่อมีภาวะออกซิเดชันสูงขึ้นจากการกินถั่วปากอ้า การได้รับยา หรือสารเคมีบางชนิด และการติดเชื้อ ทำให้ในเซลล์มีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น เมื่อไม่มีการสร้างกลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์มาทำลาย reactive oxygen species เหล่านี้ก็จะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยฮีโมโกลบินจะถูกออกซิไดซ์ ทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงกลายเป็นเฮนซ์บอดี (heinz body) ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดแดงเสียความยืดหยุ่น ประกอบกับการมี lipid peroxidation ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และเกิดภาวะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกง่ายตามมา แสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 แสดงภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (38)

2.3.1 อาการทางคลินิก

ผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD มักมีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่ต่ำกว่าในคนปกติ ซึ่งส่งผลให้ผู้ที่มีพร่องเอนไซม์ G 6-PD มีอาการทางคลินิกได้แก่ ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการกินถั่วปากอ้า การบริโภคยาบางชนิด การติดเชื้อ และภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลม

2.3.1.1 ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก (neonatal jaundice : NNJ)

ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก หมายถึง ภาวะที่มีปริมาณบิลิรูบิน (bilirubin) ในซีรัมมากกว่า 15 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม (1mg/dl) หรือ 255 ไมโครโมลต่อลิตร (255 $\mu\text{mol/L}$) (39) จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ โดยพบภาวะนี้เป็นครั้งแรกในทารกแรกเกิดชาวเอเชีย (40-41) และเมดิเตอร์เรเนียน (42) จากรายงานพบว่า ทารกเพศชายที่มีภาวะตัวเหลืองมักมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ร่วมด้วย ในขณะที่ทารกเพศหญิงที่มีภาวะตัวเหลืองพบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ได้น้อย

ปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะตัวเหลืองในเด็กทารกมีหลายปัจจัย อาทิเช่น ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกง่ายจากการที่แม่และลูกมีหมู่เลือดที่ไม่เข้ากัน เช่น แม่มีหมู่เลือดโอ ลูกมีหมู่เลือดเอ หรือบี ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกง่ายเนื่องมาจากผู้ป่วยเป็นโรคเลือด เช่น โรคธาลัสซีเมีย ในช่วงแรกเกิดเอนไซม์ Uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase) ในตับทำงานได้น้อย การป่วยเป็นโรคตับหรือภาวะท่อน้ำดีตีบตันมีผลทำให้การกำจัดบิลิรูบินเกิดได้น้อย หากในร่างกายมีปริมาณบิลิรูบินมากกว่าปกติจะทำให้บิลิรูบินซึมเข้าสู่สมองเกิดภาวะ Kernicterus ความผิดปกติของลำไส้ เช่น ลำไส้อุดตันทำให้การดูดซึมบิลิรูบินกลับเข้ามาในกระแสเลือดเกิดได้มากกว่าการขับถ่ายออกไปเกิดภาวะ hyperbilirubinemia ตามมา การติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรียของมารดาระหว่างที่มีการตั้งครรภ์ เช่น หัดเยอรมัน และซิฟิลิส การขาดไทรอยด์ฮอร์โมนแต่กำเนิดทำให้การเปลี่ยนบิลิรูบินในรูปที่ไม่ละลายน้ำมาเป็นรูปที่ละลายน้ำเกิดขึ้นได้น้อย เกิดการสะสมของบิลิรูบินในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมที่ก่อให้เกิดภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก อธิบายได้ดังนี้

ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม ในทารกแรกเกิดที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD และมีการกลายพันธุ์ของยีน Uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1 หรือยีน *UGT1A1* ที่บริเวณโปรโมเตอร์จะทำให้การสร้างเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase ที่ช่วยควบคุมบิลิรูบินกับกรดยูริคีนไดฟอสโฟกลูโคโรนิกลดน้อยลง ส่งผลให้เกิดโรคกิลเบิร์ต (Gilbert's disease) ซึ่งเป็น

สาเหตุของภาวะดีซ่านตามมา ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น เด็กอาจสัมผัสกับสารจำพวกแนฟทา린 (naphthalene) ที่ติดมากับเสื้อผ้าซึ่งทำให้เกิดภาวะที่เม็ดเลือดแดงแตกง่ายได้

2.3.1.2 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการกินถั่วปากอ้า (favism)

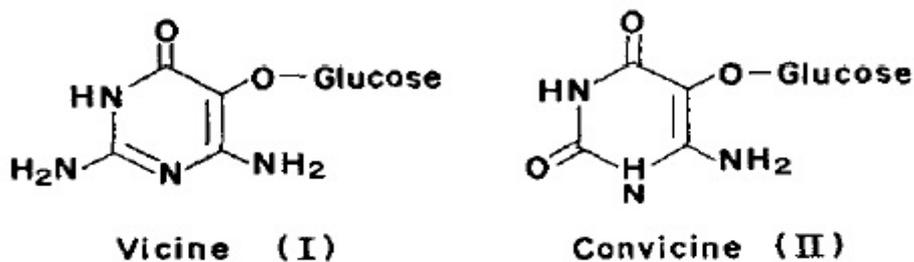
ภาวะนี้เป็นที่รู้จักมาช้านานพบบ่อยในประเทศที่มีการบริโภคถั่วปากอ้าเป็นอาหารหลัก เช่น ประเทศเมดิเตอร์เรเนียน (43) หรือพบในบริเวณที่มีการปลูกถั่วปากอ้าเป็นจำนวนมาก เช่น ตะวันออกกลางและทางตอนเหนือของทวีปแอฟริกา (16) มีรายงานว่าพบภาวะนี้ในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD ชนิด G6PD Mediterranean ซึ่งมีความรุนแรงจัดอยู่ในประเภทที่ 2 และอาจพบได้ใน G 6-PD A⁻ (43-45) หรือพบได้ในทารกที่ดื่มนมแม่ที่กินถั่วปากอ้าและพบในเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ผู้ที่มีภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการกินถั่วปากอ้ามักเป็นผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD แต่ไม่จำเป็นที่ผู้พร่องเอนไซม์ G 6-PD ทุกรายจะมีภาวะโลหิตจางเฉียบพลันเมื่อมีการกินถั่วปากอ้า สาเหตุดังกล่าวเนื่องมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและสลายสารเคมีในถั่วปากอ้า (46)

ถั่วปากอ้าแสดงดังภาพที่ 2.5 มีสาร 2 ชนิดเป็นองค์ประกอบ คือ วิซีน (vicine) และคอนวิซีน (convicine) แสดงดังภาพที่ 2.6 สารเหล่านี้ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคไซด์ (glucoside) ที่เชื่อมกับวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีชื่อว่า ไดวิซีน (divicine) และไอโซยูรามิล (isouramil) โดยการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) สารดังกล่าวสามารถผลิตสารอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งมีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์เม็ดเลือดแดง (1, 16) ผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD เมื่อบริโภคถั่วปากอ้าเข้าไปจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันและทำให้ปัสสาวะออกมาเป็นสีดำ (hemoglobinuria) (33) แสดงดังภาพที่ 2.7

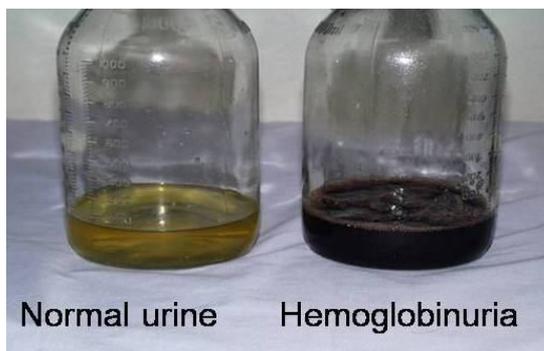
ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการกินถั่วปากอ้าจะแสดงอาการภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังที่กินถั่วปากอ้าแบบดิบและแบบสุก แต่มักพบภาวะนี้บ่อยหากกินถั่วปากอ้าที่เพิ่งเก็บใหม่ๆ จากต้น



ภาพที่ 2.5 แสดงต้นของถั่วปากอ้า (ซ้าย) และเมล็ดถั่วปากอ้าแบบปรั่งสุกและแบบดิบ (ขวา) (47-48)



ภาพที่ 2.6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารวิซีน (ซ้าย) และคอนวิซีน (ขวา) (49)

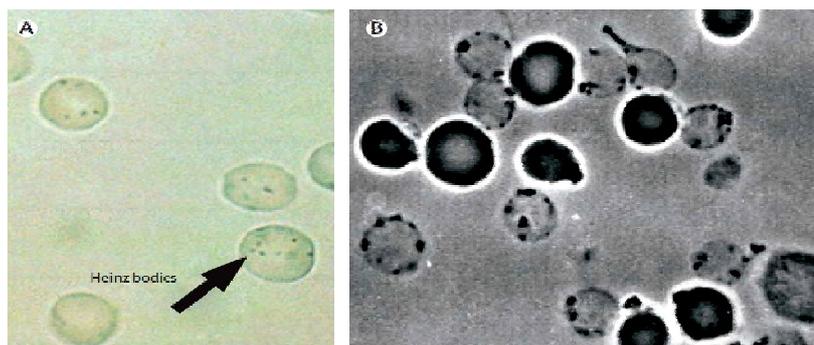


ภาพที่ 2.7 แสดงการเปรียบเทียบปัสสาวะปกติ (ซ้าย) และปัสสาวะที่มีฮีโมโกลบิน (ขวา) (18)

2.3.1.3 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการบริโภคยาบางชนิด

มีรายงานว่าพบภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เป็นครั้งแรกจากผลของการใช้ยาต้านมาลาเรียชื่อว่า ไพริมาควิน (primaquine) ในทหารชาวอเมริกันระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 (50-51) ต่อมา มีการค้นพบยาหลายชนิดรวมถึงสารเคมีที่มีผลข้างเคียง และออกฤทธิ์ให้เกิดภาวะโลหิตจางเนื่องมาจากเม็ดเลือดแดงแตกง่าย แสดงดังตารางที่ 2.2

ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจะเกิดขึ้นใน 1-2 วันหลังจากที่บริโภคยา ซึ่งอาการที่เกิดมีทั้งไม่ค่อยรุนแรงไปจนถึงระดับที่มีความรุนแรงมาก เช่น ภาวะตัวเหลือง ภาวะที่ตับโต ภาวะที่เม็ดเลือดแดงมีการเสียสภาพ และตกตะกอนของฮีโมโกลบินกลายเป็น heinz bodies (37) ดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 แสดงผลการตรวจแผ่นฟิล์มเลือดของผู้ป่วยเอนไซม์ G 6-PD ชาวอิตาเลียนเพศชาย อายุ 24 ปีซึ่งมีภาวะโลหิตจางเฉียบพลันภายหลังจากบริโภคยาแก้ปวดชื่อ พาราเซตามอน (paracetamol) (16) ภาพ A แสดง heinz bodies ที่ย้อมด้วย methyl violet และภาพ B แสดง heinz bodies เมื่อดูจาก electron microscope

นอกจากนี้ยังพบว่า ยาไพโรมาควินเป็นหนึ่งในยาหลายชนิดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD มีอายุสั้นลง (1) สำหรับการระบุชนิดของยาที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลันในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD ให้แน่ชัดเป็นเรื่องที่ยาก เนื่องจากผลของ 2 ปัจจัยที่มีในแต่ละบุคคล ได้แก่ ปัจจัยด้านพันธุกรรม และปัจจัยที่ได้รับมาภายหลัง

ปัจจัยทางพันธุกรรม เช่น ความผิดปกติของเอนไซม์ ความสมบูรณ์ของกระบวนการเผาผลาญภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง และฤทธิ์ของยาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม สำหรับปัจจัยที่ได้รับมาภายหลัง อาทิเช่น อายุ การติดเชื้อภายในเซลล์ การที่มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่แก่มากขึ้น และปริมาณยาที่ได้รับในแต่ละครั้ง รวมไปถึงการดูดซึมการเผาผลาญและการขับถ่ายของเสียต่างๆ

ตารางที่ 2.2 แสดงชื่อยาและสารเคมีที่อาจทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่ายในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD (16)

	Definite association	Possible association	Doubtful association
Antimalarials	Primaquine Pamaquine	Chloroquine	Mepacrine Quinine
Sulfonamides	Sulfanilamide Sulfacetamide Sulfapyridine Sulfamethoxazole	Sulfadimidine Sulfasalazine Glibenclamide	Aldesulfone Sulfadiazine Sulfafurazole
Sulfones	Dapsone	--	--
Nitrofurantoin	Nitrofurantoin	--	--
Antipyretic or analgesic	Acetanilide	Aspirin	Paracetamol Phenacetin
Other drugs	Nalidixic acid Niridazole Methylthionium Phenazopyridine Co-trimoxazole	Ciprofl oxacin Chloramphenicol Vitamin K analogues Ascorbic acid Mesalazine	Aminosalicylic acid Doxorubicin Probenecid Dimercaprol
Other chemicals	Naphthalene 2,4,6-trinitrotoluene	Acalypha indica extract	

2.3.1.4 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันที่เกิดจากการติดเชื้อ

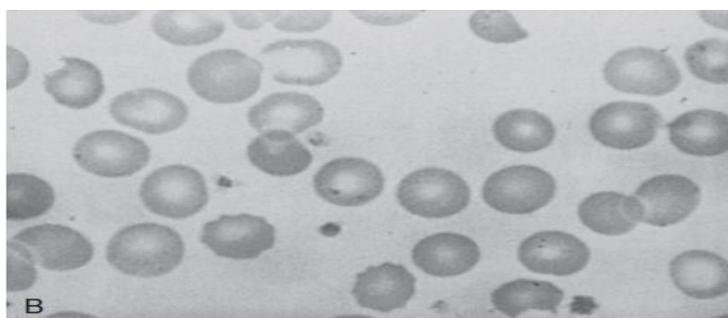
ในการรักษาทางคลินิก การติดเชื้อต่างๆ เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลันในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD มากกว่าการได้รับยา สารเคมี หรือการบริโภคถั่วปากอ้า (1) การติดเชื้อที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลัน อาทิเช่น ไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและบี (hepatitis viruses A, B) การติดเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส (cytomegalovirus : CMV) (52) โรคปอดอักเสบ (pneumonia) (53) และไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) (16) ทั้งนี้ความรุนแรงของการแตกของเม็ดเลือดแดงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การทำงานของตับ อายุของผู้ป่วย และการใช้ยาต่างๆ

มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงความสำคัญของการติดเชื้อต่างๆ ที่ส่งผลให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลันตามมา (54-55) แต่กลไกดังกล่าวไม่ทราบแน่ชัดสันนิษฐานว่า อาจเกิดจากเมื่อมีการติดเชื้อจะมีการรวมตัวของโพลีมอร์ฟนิวเคลียร์ลิวโคไซด์ (polymorphonuclear leukocyte : PMN) ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูลออกมาทำลายเชื้อโรคเป็นจำนวนมาก เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะปล่อยเอนไซม์และสารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ ไนตริกออกไซด์เพื่อทำลายเชื้อโรค (56) ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงที่อยู่รอบๆ และมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ถูกทำลายไปเกิดภาวะโลหิตจางจากการที่เม็ดเลือดแดงแตกตามมา (22)

2.3.1.5 ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลม (chronic non-spherocytic hemolytic anemia : CNSHA)

ในปีพุทธศักราช 2501 มีการค้นพบความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD ที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลมเป็นครั้งแรก (57) ภาวะนี้มักพบในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD ชนิดที่มีความรุนแรงโดยจัดอยู่ในประเภทที่ 1 (16, 58) ซึ่งมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในเอกซอนที่ 10 ระหว่างนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,100 ถึง 1,200 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับบริเวณที่คูไดเมออร์มาประกบกัน (59) หรือเป็นตำแหน่ง coenzyme binding site ที่จับกับโมเลกุล NADP (60)

ผู้ป่วยภาวะ CNSHA มักเป็นทารก หรือเด็กเล็กและเคยมีประวัติป่วยเป็นภาวะตัวเหลืองตั้งแต่เกิดหรือมีภาวะโลหิตจางเรื้อรังมาก่อน (16) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่ายตลอดเวลา สาเหตุเป็นเพราะโปรตีนที่ผิวเม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติมาแต่กำเนิด ดังนั้นการตรวจแผ่นฟิล์มเลือดของผู้ป่วยภาวะ CNSHA จึงไม่พบเม็ดเลือดแดงรูปกลม แสดงดังภาพที่ 2.9 นอกจากนี้มักไม่เจอภาวะ CNSHA ในผู้พร่องเอนไซม์ G 6-PD ชนิด A⁻ และ Mediterranean (1)



ภาพที่ 2.9 แสดงภาวะโลหิตจางเรื้อรังแต่กำเนิดแบบเม็ดเลือดแดงรูปปกติไม่กลม (chronic non-spherocytic hemolytic anemia : CNSHA) (25)

2.4.2 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นภูมิภาคหนึ่งที่มีความหลากหลายทางเชื้อชาติ ศาสนา และวัฒนธรรม ในภูมิภาคนี้ยังมีรายงานการระบาดของมาลาเรียตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียนั้นมีความสัมพันธ์กับความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาติพันธุ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาติพันธุ์ต่างๆ

เชื้อชาติ	ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (ร้อยละ)	รายการอ้างอิง
ไทย (Thai)	เพศชาย	11.1
	เพศหญิง	5.8
พม่า (Burmese)	เพศชาย	7.3-11.0
มาเลย์ (Malay)	เพศชาย	4.6
	เพศหญิง	1.3
มอญ (Mon)	เพศชาย	6.7-12.0
เขมร (Cambodian)	เพศชาย	12.6-26.1
	เพศหญิง	3.1
ฉาน (Shan)	เพศชาย	10.8
ดานู (Danu)	เพศชาย	7.1
คะฉิ่น (Kachin)	เพศชาย	6.3
อะบอริจิน (Amboiness)	เพศชาย	6.0
ลิสู (Lisu)	เพศชาย	2.6
ลาว (Lao)	เพศชาย	7.2
ชาวเกาะภูเก็ต (Phuket islanders)	เพศชาย	9.8

2.5 ความสัมพันธ์ของมาลาเรียและภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

การศึกษาเพื่อดูความสัมพันธ์ของมาลาเรียและภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยอาศัยทางด้านภูมิศาสตร์ในบริเวณต่างๆ ทั่วโลก พบว่าความชุกของมาลาเรียที่พบในบริเวณใกล้เส้นศูนย์สูตรมีค่าใกล้เคียงกับภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (66) ดังแสดงในภาพที่ 2.9 ผลของความชุกที่ใกล้เคียงกันดังกล่าวจึงเป็นที่มาของสมมติฐานที่ว่า ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่เพิ่มสูงขึ้นเป็นผลจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) โดยจีโนมของมนุษย์มีวิวัฒนาการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ส่งผลให้มีการแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD รูปแบบต่างๆที่มีความจำเพาะต่อประชากรในแต่ละชาติพันธุ์ ซึ่งกลไกดังกล่าวเป็นการป้องกันและลดความรุนแรงของโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และชนิดไวแวกซ์ (*Plasmodium vivax*) (67) ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่เกิดขึ้นน่าจะมีประโยชน์ต่อประชากรกล่าวคือ ประชากรที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD จะอยู่รอดในบริเวณที่มีการระบาดของมาลาเรียได้มากกว่าประชากรปกติ เนื่องจากภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางที่มีสาเหตุจากเม็ดเลือดแดงแตกง่ายและมีผลต่อวงจรชีวิต (life cycle) ของเชื้อมาลาเรียซึ่งตรงกับทฤษฎีของศาสตราจารย์ฮอลเดน (J.B.S. Haldane) ที่กล่าวว่าความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงรูปแบบต่างๆ เช่น ความผิดปกติของฮีโมโกลบิน ภาวะธาลัสซีเมียแฝง และภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD อาจปกป้องประชากรจากความรุนแรงของเชื้อมาลาเรียได้ (68)

2.6 การตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

การตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD มีหลายวิธีทั้งในเชิงคุณภาพวิเคราะห์และเชิงปริมาณวิเคราะห์ อาทิเช่น การทดสอบรีดิวซ์ของเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin reduction test : MRT) การทดสอบโดยวิธีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent spot test) การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD (quantitative G6PD activity assay) การตรวจโดยใช้สี Brilliant cresyl blue (brilliant cresyl blue decolorization test) และ Ascorbate-cyanide method (16, 18) การใช้วิธีดังกล่าวข้างต้น ตรวจสอบในผู้ชายที่มีความผิดปกติของยีน *G6PD* (hemizygote) และในผู้หญิงที่มีความผิดปกติของยีน *G6PD* บนโครโมโซมเพศ X ทั้ง 2 ข้าง (homozygote) จะมีความน่าเชื่อถือมากกว่าการตรวจสอบในผู้หญิงที่มีความผิดปกติของยีน *G6PD* เพียงข้างเดียว (heterozygote) เนื่องจากผู้ชายที่เป็น hemizygote และผู้หญิงที่เป็น homozygote จะมีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งแตกต่างกับกรณีของผู้หญิงที่เป็น heterozygote จะมีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่สูงกว่าและค่าค่อนข้างกว้าง เนื่องจากมีการแสดงออกของโครโมโซมเพศ X ข้างใดข้างหนึ่งเท่านั้นจากผลของกลไก Random X-Inactivation (69) ดังนั้นการ

ตรวจสอบที่ถูกต้องและแม่นยำควรวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (70-71)

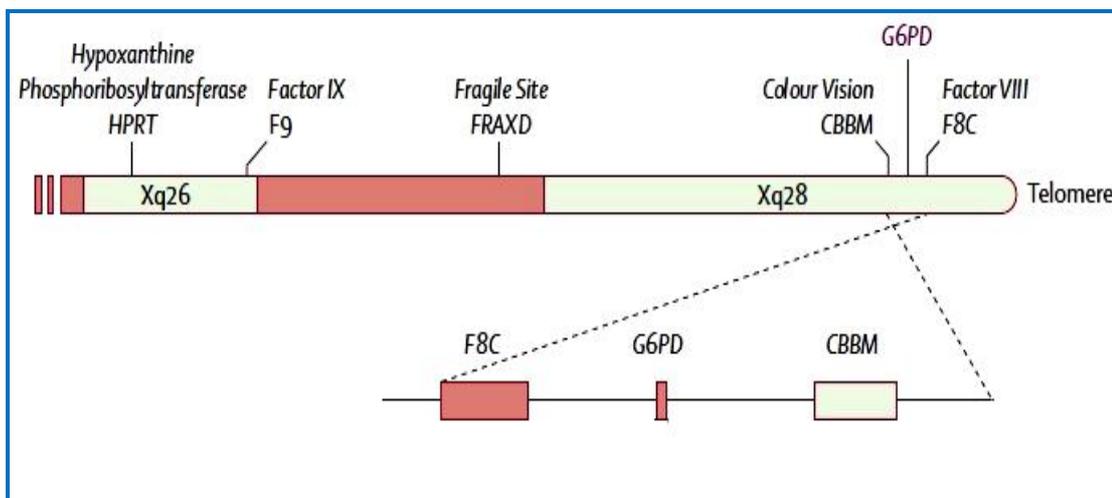
การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD (quantitative G 6-PD activity assay) โดยใช้ Spectrophotometer เป็นการทดลองตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก หรือ WHO ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ อาศัยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (nm) เมื่อ NADP เปลี่ยนเป็น NADPH โดยการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของเอนไซม์ G 6-PD โดยมีหน่วยเป็น IU/gHb

สำหรับการตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่ใช้เวลาน้อยและมีความรวดเร็วมาก เป็นการศึกษาเชิงคุณภาพวิเคราะห์ อาทิเช่น วิธี Dye-decolouration test ซึ่งถูกพัฒนาโดย Motulsky ในปีคริสต์ศักราช 1961 และวิธีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent spot test) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายวิธีนี้จะวัดปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ซึ่ง NADPH มีคุณสมบัติเรืองแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่นยาว ถ้าหากมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะไม่มีการเรืองแสงหรือมีการเรืองแสงน้อย

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* รูปแบบต่างๆ ทั้งที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ หรือเป็นรูปแบบใหม่ในห้องปฏิบัติการจะนิยมใช้เทคนิค ดังนี้ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เทคนิค Direct sequencing เทคนิค Electrophoresis และเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

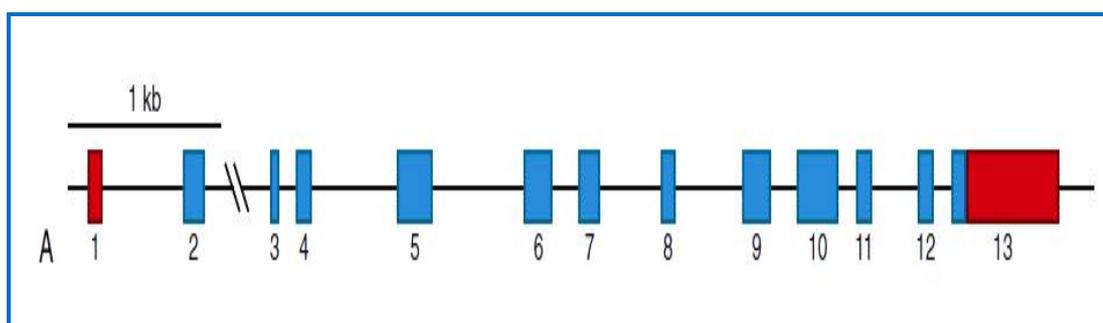
2.7 พันธุศาสตร์ของยีนสร้างเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส

ในมนุษย์ยีนสร้างเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส มีชื่อว่า *G6PD* หรือ *Gd* ยีนนี้อยู่บริเวณส่วนปลายของโครโมโซมเพศ X ตำแหน่งเอ็กซ์คิว 28 (Xq28) (19) ซึ่งใกล้กับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด (factor VIII, *F8C*) และยีนที่ควบคุมการมองเห็นสี (colour vision, *CBBM*) แสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 แสดงตำแหน่งของยีน *G6PD* บนโครโมโซมเพศ X บริเวณ Xq28 (16)

ในปีคริสต์ศักราช 1986 มีการโคลนยีน *G6PD* เพื่อทำการศึกษายีน *G6PD* เป็นยีนลำดับแรกของจีโนมมนุษย์ที่มีการหาลำดับทางพันธุกรรมจนแล้วเสร็จ (72) นอกจากนี้การศึกษาระดับโมเลกุลพบว่ายีน *G6PD* มีความยาวประมาณ 18.5 กิโลเบส (Kb) หรือใกล้เคียง 20 กิโลเบส ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter region) เอกซอน (exons) จำนวน 13 เอกซอน และอินทอน (introns) จำนวน 12 อินทอน (16) ไดอะแกรมของยีน *G6PD* แสดงดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 แสดงแผนภาพของยีน *G6PD* ในมนุษย์ (25) กล่องสี่เหลี่ยมแสดงถึงเอกซอนที่ 1-13 โดยที่กล่องสี่เหลี่ยมสีฟ้าแสดงเอกซอนที่สร้างกรดอะมิโน และบริเวณกล่องสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงบริเวณที่ไม่มีการสร้างกรดอะมิโน

โปรโมเตอร์ของยีน *G6PD* อยู่ก่อนถึงบริเวณที่สร้างอาร์เอ็นเอประมาณ 120 เบส ซึ่งเป็นส่วนที่มีเบสกวีนีน (guanine, G) และเบสไซโตซีน (cytosine, C) อยู่เป็นจำนวนมากหรือประมาณร้อยละ 70 เรียกบริเวณดังกล่าวว่า CpG Island (16, 73) นอกจากนี้โปรโมเตอร์ของยีน *G6PD* มีบริเวณที่ให้ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) ได้แก่ SP1-GGCGGG และ CCGCCC มาจับได้หลายตำแหน่งเช่นเดียวกับ housekeeping gene อื่นๆ (16, 74)

การศึกษาในยีน *G6PD* พบว่าบริเวณเอกซอนที่ 1 และบางส่วนของเอกซอนที่ 2 เป็นส่วนของ 5'-Untranslated region (5'UTR) ที่ไม่มีการสร้างกรดอะมิโน (75) แต่บริเวณที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโนอยู่ในบริเวณเอกซอนที่ 2 จนถึงบางส่วนของเอกซอนที่ 13 โดยในบริเวณเอกซอนที่ 2 มีลำดับเบสที่สร้างกรดอะมิโนตัวแรกคือ ATG (1, 76-77) เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน *G6PD* มีความยาวทั้งหมด 2,269 เบส ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ ส่วนแรกคือ 5'-UTR มีนิวคลีโอไทด์ 69 เบส ส่วนที่สองคือ เอกซอนทั้ง 12 เอกซอนที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโน 515 ตัว มีนิวคลีโอไทด์ 1,545 เบส สร้างเป็นเอ็นไซม์ขนาด 59.265 กิโลดาลตัน (kDa) และส่วนสุดท้ายคือ 3'-UTR มีนิวคลีโอไทด์ 655 คู่เบส อินทรอนของยีน *G6PD* ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กกว่า 300 คู่เบส (bp) ยกเว้นในอินทรอนที่ 2 มีขนาดใหญ่ประมาณ 12 กิโลเบส ความสำคัญของบริเวณดังกล่าวยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของกระบวนการถอดรหัสสารพันธุกรรม (transcription process) เช่นเดียวกับการศึกษาในยีน *G6PD* ในปลาปักเป้า (puffer fish) สกุล *Fugu rubripes* (78) ข้อมูลของยีน *G6PD* แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงข้อมูลดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนของยีน *G6PD* (16)

DNA	
Size of gene	18.5 kb
Exons	13 exons
Introns	12 introns
mRNA	
Size in nucleotides	2,269 base
5'-Untranslated region	69 base
Coding region	1,545 base
3'-Untranslated region	655 base
Protein	
Amino acids	515 amino acids
Molecular weight	59.265 kDa
Subunits per molecule of active enzyme	2 or 4 subunits
Molecules of tightly bound NADP per subunit	1

ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency) เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *G6PD* ที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสของนิวคลีโอไทด์ในยีนปกติ (nucleotide substitution) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนรหัสกรดอะมิโนที่สร้างเอนไซม์ G 6-PD เกิดความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD (*G6PD* variant) (79) ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน *G6PD* ส่งผลต่อเอนไซม์ G 6-PD ในด้านของคุณภาพและปริมาณ เนื่องจากการกลายพันธุ์ในยีน *G6PD* ทำให้โครงสร้างความเสถียร (stability) และประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD มีการเปลี่ยนแปลง (25)

การกลายพันธุ์บริเวณ coding sequence ของยีน *G6PD* ส่วนใหญ่ทำให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (76) ปัจจุบันพบรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ประมาณ 160 รูปแบบ (30, 80) การกลายพันธุ์เกิดจากหลายรูปแบบดังนี้

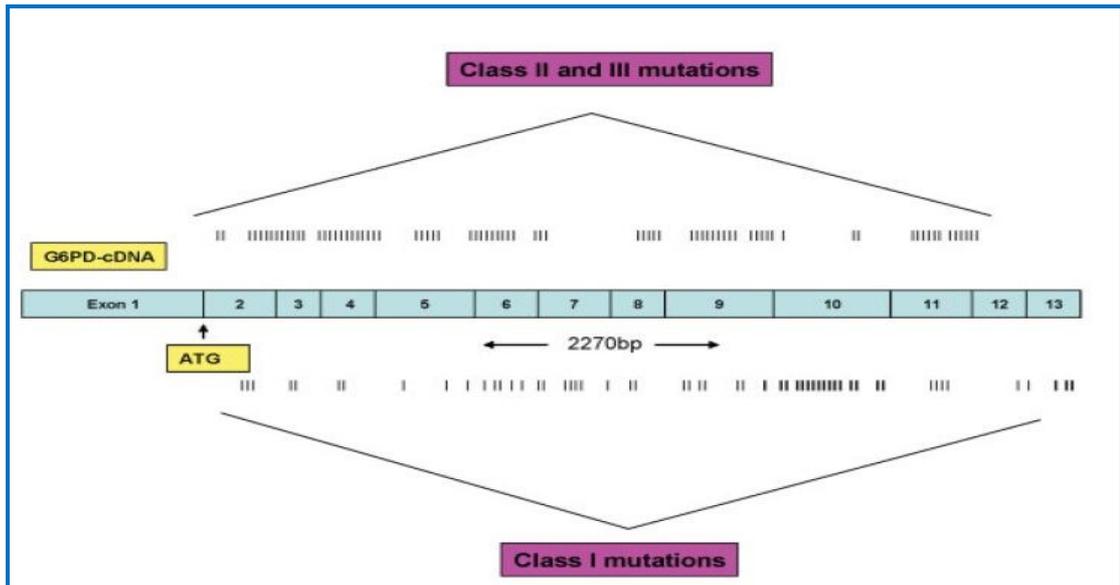
1. การเปลี่ยนแปลงเบสของนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียวเรียกว่า point mutation แบบ nonsynonymous mutation ซึ่งเป็นการแทนที่ของเบสมีผลทำให้การเรียงตัวของ

กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอาจพบทั้งชนิด missense mutation และ nonsense mutation ที่เปลี่ยนมาเป็นรหัสหยุด (stop codon) มีรายงานว่าพบการกลายพันธุ์แบบ point mutation 2 ตำแหน่งได้ในบางกรณีอาทิเช่น G6PD A⁻ และ G6PD Santamaria โดย G6PD A⁻ มีการเปลี่ยนเบสในนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 376 และ 202 (376A→G : Asparagine 126 Aspartic acid และ 202G→A : Valine 68 Methionine) ซึ่ง G6PD A⁻ จัดอยู่ในประเภทที่ 3 และมักพบ G6PD A⁻ ในชาวแอฟริกัน (36) G6PD Santamaria พบครั้งแรกในประเทศคอสตาริกา (Costa Rica) และ อิตาลีทางตอนใต้บางส่วนมีการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งได้แก่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 376 และ 542 (376A→G : Asparagine 126 Aspartic acid และ 542A→T : Aspartic acid 181 Valine) การกลายพันธุ์ชนิดนี้จัดอยู่ในประเภทที่ 2 (81-82)

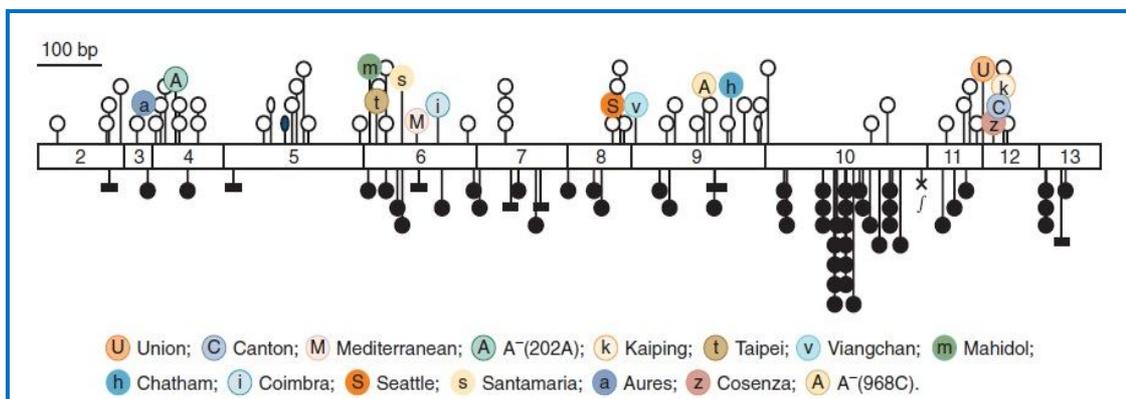
2. รูปแบบที่มีการหายไปของเบสจำนวน 1-3 เบสที่เรียกว่า small deletion หรือการหายไปมากกว่า 3 เบส ทำให้จำนวนกรดอะมิโนของยีน *G6PD* หายไป 1 ตัว 2 ตัว หรือ 8 ตัวตามลำดับ เช่นในกรณีของ G6PD Sunderland มีการหายไปของลำดับเบสตำแหน่งที่ 105-107 ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 35 Isoleucine ขาดหายไป (83) G6PD Stonybrook มีการหายไปของลำดับเบสตำแหน่งที่ 724-729 ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 242-243 คือ Glycine และ Threonine ขาดหายไป (35) และ G6PD Nara มีการหายไปของลำดับเบสตำแหน่งที่ 953-976 ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 319-326 ได้แก่ TKGYLDDP หายไป (84)
3. การขาดหายไปของเบส AG บริเวณ 3' acceptor splice site ที่บริเวณอินทรอนที่ 10 และเอกซอนที่ 11 ทำให้เกิดความผิดพลาดในกระบวนการ splicing ของ post transcriptional process ส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนในเอกซอนนั้นๆ มีความผิดปกติ ตัวอย่างของการกลายพันธุ์รูปแบบนี้เช่น G6PD Vansdorf (85) ที่ทำให้เกิดภาวะ non-spherocytic hemolytic anemia

เนื่องจากเอนไซม์ G 6-PD มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตที่ช่วยปกป้องเซลล์จากพิษของสารประกอบออกซิเจน ดังนั้นจึงไม่ค่อยพบรายงานว่ามีการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation และ nonsense mutation ในยีน *G6PD* เพราะการกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดมีผลทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด (UAA, UAG และ UGA) เมื่อไม่มีการสร้างเอนไซม์ G 6-PD ขึ้นในเซลล์จะทำให้เซลล์ที่ขาดเอนไซม์ G 6-PD ไม่สามารถเจริญเติบโตและตายในที่สุด (18, 86)

จากรายงานทั่วโลกพบการกลายพันธุ์ในทุกส่วนของยีน *G6PD* โดยเฉพาะส่วนของเอกซอน การกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ชนิดรุนแรงมักอยู่บริเวณด้านปลาย 3' ของยีน *G6PD* ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในทุกเอกซอน แสดงดังภาพที่ 2.13 และ 2.14

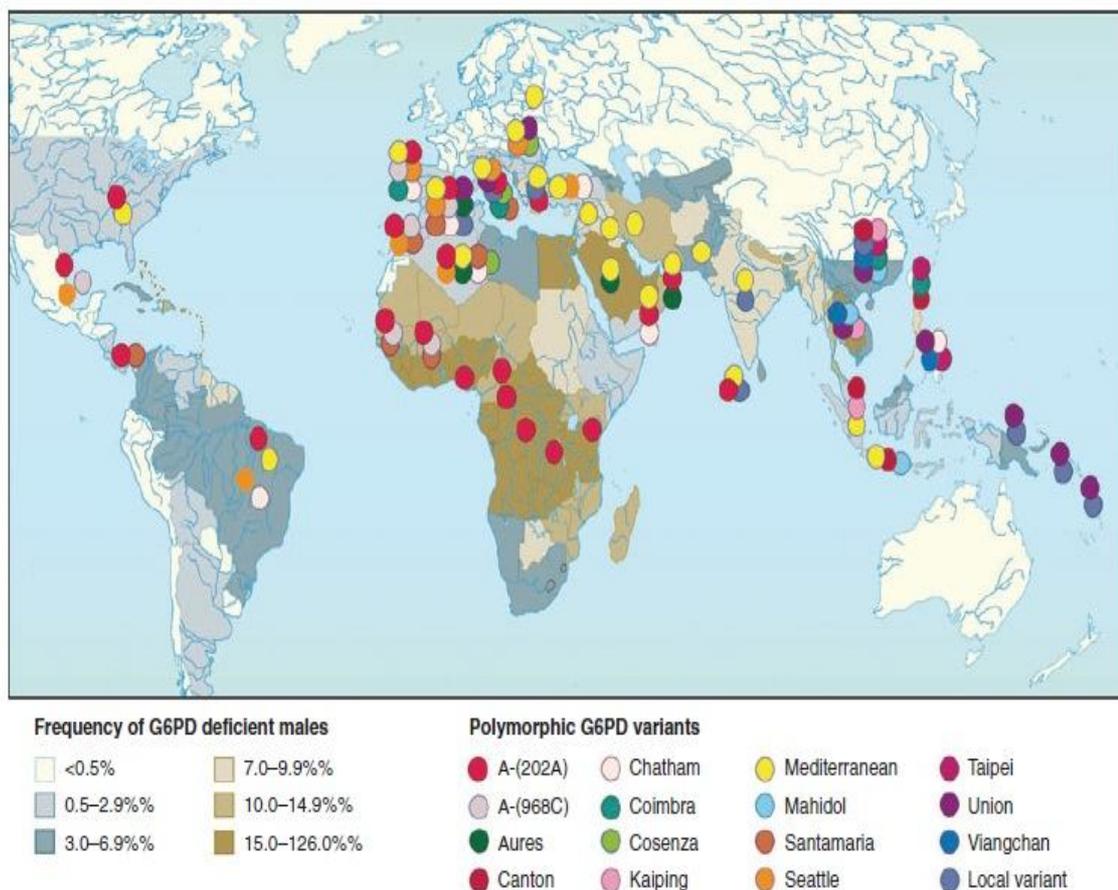


ภาพที่ 2.13 แสดงการกลายพันธุ์แบบ point mutation ที่เกิดขึ้นในบริเวณ coding region ของยีน *G6PD* (30) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในเอกซอนที่ 10 และ 13 ทำให้เกิดภาวะ chronic hemolytic anemia (CHA) เนื่องจากบริเวณเอกซอน 10 เกี่ยวข้องกับการจับกันของคู่อิเล็กตรอนของเอนไซม์ G 6-PD และบริเวณเอกซอน 13 เกี่ยวข้องกับการเข้าจับของ NADP



ภาพที่ 2.14 แสดงรูปแบบและชนิดการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนเอกซอนที่ 2-13 ของยีน *G6PD* (25) สีเหลี่ยมที่มีหมายเลข 2-13 แสดงถึงเอกซอนที่ 2-13 ของยีน *G6PD* สามารถแบ่งกลุ่มความรุนแรงของรูปแบบการกลายพันธุ์ออกเป็น 2 สีได้แก่ บริเวณสีดำ หมายถึงการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความแปรผันของเอนไซม์ชนิดรุนแรงประเภทที่ 1 บริเวณสีขาวแสดงถึงการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความแปรผันของเอนไซม์ชนิดปานกลางประเภทที่ 2 และ 3 วงกลมสีต่างๆแสดงถึงชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่เกิดบนเอกซอนต่างๆ

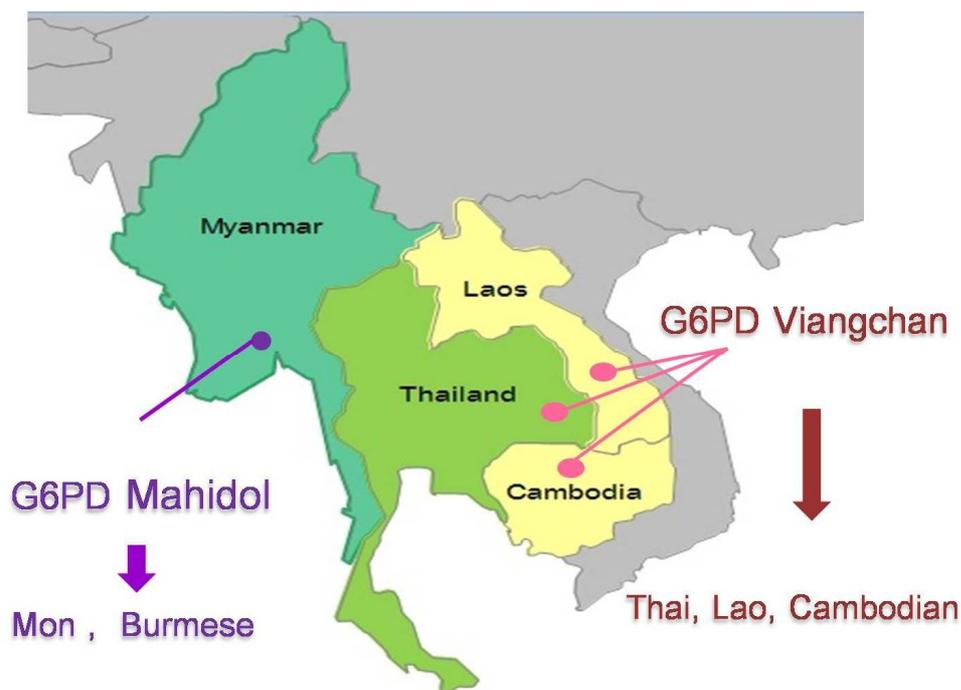
การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เป็นความผิดปกติของเอนไซม์ที่พบผู้ป่วยประมาณ 400 ล้านคนทั่วโลก (16) โดยที่การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อประชากรในแต่ละเชื้อชาติและภูมิภาคที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ (6) ดังนั้นประชากรชาติพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลกจะมีความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และความจำเพาะต่อชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่แตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.15 แสดงความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก (25) การไล่สีแสดงถึงระดับความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่พบในแต่ละภูมิภาค วงกลมสีต่างๆ แสดงถึงชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่แพร่กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก

ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นภูมิภาคหนึ่งที่มีความหลากหลายทางเชื้อชาติ ศาสนา ภาษา และวัฒนธรรม มีรายงานชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อยในภูมิภาคนี้จำนวน 2 รูปแบบ ได้แก่ ชนิดเวียงจันทน์ (*G6PD* Viangchan : 871G→A : Valine 291 Methionine) พบมากในชาวไทย (5) ลาว (6) และเขมร (7) ชนิดมหิดล (*G6PD* Mahidol : 487G→A : Glycine 163 Serine) พบมากในชาวพม่า (4, 8, 84) และมอญ (4) เมื่อมีการพิจารณาหลักฐานต่างๆ ประกอบจึงสรุปได้ว่า สามารถแบ่งกลุ่มบรรพบุรุษของประชากรในบริเวณนี้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มชาวพม่าและมอญซึ่งอาศัยอยู่ทางตะวันตกของคาบสมุทรอินโดจีน มักพบการกลายพันธุ์ชนิด

มหิดล (6) และกลุ่มชาวไทย ลาว และเขมรที่อาศัยอยู่บริเวณศูนย์กลางและค่อนข้างออกไปทางตะวันออกของคาบสมุทร ที่มักพบการกลายพันธุ์ชนิดเวียงจันทน์ แสดงดังภาพที่ 2.16



ภาพที่ 2.16 แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

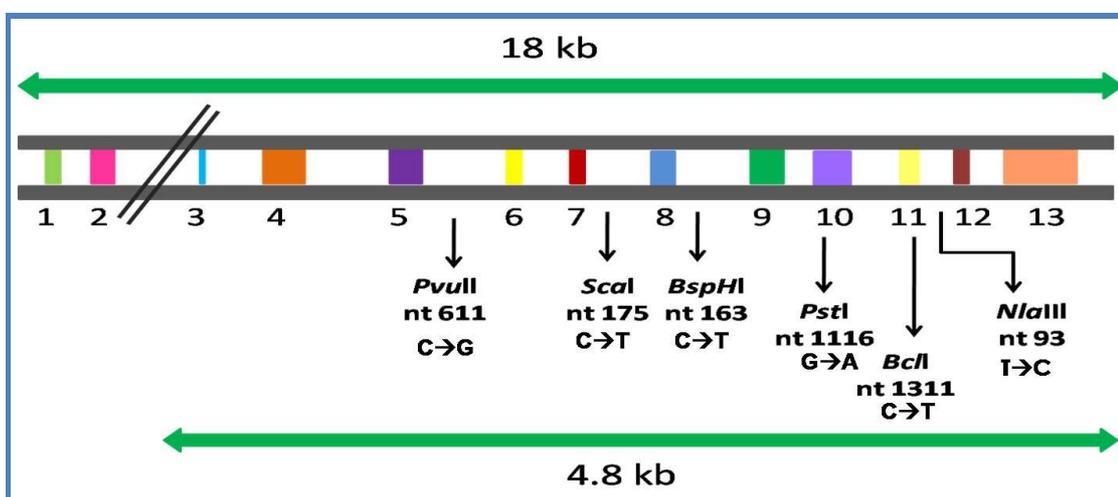
เมื่อพิจารณาในรูปที่ 2.14 2.15 และ 2.16 พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดมหิดลซึ่งพบมากในชาวพม่าและมอญเกิดขึ้นในบริเวณเอกซอนที่ 6 และการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดเวียงจันทน์ที่พบมากในชาวไทย ลาว และเขมรเกิดในบริเวณเอกซอนที่ 9

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ย่อมมีความจำเพาะในประชากรแต่ละเชื้อชาติ แต่ในบางพื้นที่หรือบางประเทศพบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในประชากรหลากหลายรูปแบบ แสดงดังภาพที่ 2.15 สาเหตุเนื่องมาจากการอพยพย้ายถิ่นของประชากรจากพื้นที่หนึ่งไปสู่พื้นที่หนึ่ง หรือมีการแต่งงานระหว่างประชากร 2 เชื้อชาติ (18) การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่จำเพาะในประชากรเชื้อชาติต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.5

ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD มีการถ่ายทอดยีน *G6PD* ผ่านทางโครโมโซมเพศ X เรียกว่าการถ่ายทอดแบบ X-linked recessive ส่งผลให้พบความผิดปกติในเพศชายมากกว่าเพศหญิง เนื่องจากเพศชายมีลักษณะ genotype เป็น hemizygote หากโครโมโซมเพศ x มีการกลายพันธุ์จะแสดงออกอย่างชัดเจน ในขณะที่เพศหญิงมี genotype เป็นแบบ heterozygote หรือ homozygote

ความรุนแรงและอาการทางคลินิกจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเม็ดเลือดแดง 2 ชนิด คือ ชนิดพ่วงเอนไซม์และชนิดที่มีเอนไซม์ปกติที่ถูกควบคุมจากกลไก random X-inactivation (87)

ยีน *G6PD* นอกจากจะมีการกลายพันธุ์ที่หลากหลายแล้ว ยังมีภาวะพหุสัณฐานหรือโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ โดยที่การกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและไม่มีผลต่อสุขภาพ (18) โพลิมอร์ฟิซึมสามารถตรวจสอบได้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction fragment length polymorphism : RFLP) โพลิมอร์ฟิซึมในยีน *G6PD* ที่พบบ่อยทั่วโลก แสดงดังภาพที่ 2.17 และตารางที่ 2.6 (18, 88)



ภาพที่ 2.17 แสดงตำแหน่งของโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆ ในยีน *G6PD* โดยสีเหลี่ยมสีต่างๆแสดงถึงเอกซอนที่ 1-13 ของยีน *G6PD*

ตารางที่ 2.5 แสดงชนิดการกลายพันธุ์ ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนของยีน *G6PD* ซึ่งมีความจำเพาะในประชากรเชื้อชาติต่างๆ

ชนิดการ กลายพันธุ์	ลำดับ เบส	เบสที่ เปลี่ยน	ลำดับกรด อะมิโน	เปลี่ยนจาก	เปลี่ยนเป็น	เชื้อชาติ
A	376	A→G	126	Asparagine	Aspartic acid	
A ⁻	376	A→G	126	Asparagine	Aspartic acid	แอฟริกัน
	202	G→A	68	Valine	Methionine	
Mediterranean	563	C→T	188	Serine	Phenylalanine	ยุโรป
Coimbra	592	C→T	198	Arginine	Cysteine	
Chatham	1,003	G→A	335	Alanine	Threonine	ตะวันออก
Aures	143	T→C	48	Isoleucine	Threonine	กลาง
Orissa	131	C→G	44	Alanine	Glycine	อินเดีย และ เอเชียใต้
Kerala-Kalyan	949	G→A	317	Glutamine	Lysine	
Canton	1,376	G→T	459	Arginine	Leucine	ทางใต้ของจีน
Kaiping	1,388	G→A	463	Arginine	Histidine	มณฑลกว๋างตุ้ง
Gaohe	95	A→G	31	Histamine	Arginine	ทางตะวันตก
Chinese-4	392	G→T	131	Glycine	Valine	เฉียงใต้ของจีน
Chinese-5	1,024	C→T	342	Leucine	Phenylalanine	
Nankang	517	T→C	173	Phenylalanine	Alanine	จีน
Chinese-3	493	A→G	165	Asparagine	Aspartic acid	จีนยกเกี้ยน
Viangchan	871	G→A	291	Valine	Methionine	ไทย ลาว เขมร
Mahidol	487	A→G	163	Glycine	Serine	พม่า มอญ
Ube Konan	241	C→T	81	Arginine	Cysteine	ญี่ปุ่น

ตารางที่ 2.6 แสดงบริเวณที่พบโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *G6PD* ทั้ง 6 ตำแหน่ง และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ตรวจสอบ (IVS (intervening segment) คือลำดับเบสที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน)

บริเวณ	ลำดับเบส	เบสที่เปลี่ยน	เอนไซม์ตัดจำเพาะ
IVS 5	611	C→G	<i>PvuII</i>
IVS 7	175	C→T	<i>Scal</i>
IVS 8	163	C→T	<i>BspHI</i>
Exon 10	1,116	G→A	<i>PstI</i>
Exon 11	1,311	C→T	<i>BclI</i>
IVS 11	93	T→C	<i>NlaIII</i>

ในการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นในบุคคล นิยมศึกษาหลายตำแหน่งร่วมกันเป็นชุดๆ หรือแฮปโลไทป์ (haplotype) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของการกลายพันธุ์และประชากรแต่ละชาติพันธุ์ โดยทั่วไปประชากรในโลกจะมีรูปแบบของแฮปโลไทป์ของ *G6PD* B ทั้งหมด 4 รูปแบบ ได้แก่ 1,311C, 93T 1,311C, 93C 1,311T, 93T และ 1,311T, 93C และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดเวียงจันทน์ และชนิดแจมมู (*G6PD* Jammu) มีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 871 G→A เหมือนกันแต่มีแฮปโลไทป์ของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,311 C→T และ 93 T→C ที่ต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.7 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาภาวะพหุสัณฐานในนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,311 และ 93 ร่วมกันเพื่อช่วยในการวิเคราะห์และแยกชนิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวได้อย่างชัดเจน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Polymerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism : PCR-RFLP)

โพลิมอร์ฟิซึมของยีน *G6PD* มีหลายตำแหน่งและแต่ละตำแหน่งมีความจำเพาะต่อประชากรแต่ละเชื้อชาติ ดังนั้นการศึกษากการกลายพันธุ์ร่วมกับแฮปโลไทป์ของโพลิมอร์ฟิซึมจะช่วยให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์เชิงพันธุศาสตร์ประชากรของชาติพันธุ์ต่างๆ และทำให้ทราบวิวัฒนาการของยีน *G6PD* ได้

ตารางที่ 2.7 แสดงภาวะพหุสัณฐานของยีน *G6PD* บริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,311 และ 93 ในคนปกติ คนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดเวียงจันทน์ แจมมู และมหิดล

Mutation	Nucleotide substitution	Ethnic groups	Haplotype	
			1,311	93
G6PD B	--	Worldwide	C	T
			C	C
			T	T
			T	C
G6PD Viangchan	871 G→A	Thai Lao	T	C
		Cambodian		
G6PD Jammu	871 G→A	Indian	C	T
G6PD Mahidol	487 G→A	Mon Burmese	C	T

2.8 ชาติพันธุ์กะเหรี่ยง

ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีความหลากหลายทางเชื้อชาติ ภาษา และวัฒนธรรม ชาวกะเหรี่ยง (Karen) เป็นกลุ่มชาติพันธุ์หนึ่งที่ยังไม่ทราบถิ่นกำเนิดที่แน่ชัด แต่คาดว่าประมาณปีคริสต์ศักราช 600-700 ชาวกะเหรี่ยงได้อพยพมาอยู่ในประเทศพม่าและมีการเพิ่มจำนวนประชากรเรื่อยๆ จนกลายเป็นชนกลุ่มใหญ่อันดับสองของประเทศที่มีประชากรมากกว่า 2,000,000 คน กะเหรี่ยงในประเทศพม่าส่วนใหญ่อาศัยอยู่ที่รัฐกะเหรี่ยง (Karen state) เขตตะนาวศรี (Tenasserim) ซึ่งอยู่ทางตะวันออกเฉียงของพม่า เขตอิรวดี (Irrawaddy Delta) และเขตพะโค (Pegu) ซึ่งเป็นศูนย์กลางของพม่า แสดงดังภาพที่ 2.18 นอกจากนี้ในรัฐฉานและบริเวณอื่นของประเทศพม่าก็มีชาวกะเหรี่ยงอาศัยอยู่แต่ไม่มากเท่า 4 รัฐข้างต้น



ภาพที่ 2.18 แสดงแผนที่ประเทศพม่าบริเวณที่มีการอาศัยของชาวกะเหรี่ยง (9)

ตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 2005 มีผู้ลี้ภัยชาวกะเหรี่ยงมากกว่า 50,000 คน อพยพย้ายถิ่นไปตั้งถิ่นฐานที่สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา นิวซีแลนด์ และประเทศในทวีปยุโรป (9) ในปัจจุบันมีชาวกะเหรี่ยงบางส่วนอพยพมาอยู่ทางภาคเหนือและตะวันตกของประเทศไทยกว่า 300,000 คน (9) ชาวกะเหรี่ยงแบ่งได้เป็นหลายเผ่าพันธุ์ หลายภาษา และมีการนับถือศาสนาที่แตกต่างกัน แต่เดิมกะเหรี่ยงจะนับถือผีและมีความเชื่อเรื่องวิญญาณ ต่อมาชาวกะเหรี่ยงหันมานับถือศาสนาพุทธและศาสนาคริสต์ ชาวกะเหรี่ยงมีหลายเผ่าพันธุ์ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ได้แก่

1. กะเหรี่ยงสะกอ (Skaw Karen) หรือที่เรียกตัวเองว่า ปากะญอ (*Pwar Kar Nyaw*) เป็นกะเหรี่ยงกลุ่มที่มีจำนวนมากที่สุด มักอาศัยอยู่บริเวณภูเขาและบริเวณที่ราบต่ำ ประชากรส่วนใหญ่ นับถือศาสนาคริสต์ กะเหรี่ยงสะกอหรือปากะญอ มีภาษาเขียน

เป็นของตนเอง โดยมีมิชชันนารีเป็นผู้คิดค้นและดัดแปลงมาจากตัวอักษรพม่าและตัวอักษรโรมัน (89) ในประเทศไทยกะเหรี่ยงกลุ่มนี้อาศัยอยู่ที่จังหวัดตาก แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย กาญจนบุรี และราชบุรี

2. กะเหรี่ยงโปว์ (Pwo Karen, *Ploe*) เป็นกะเหรี่ยงที่พบมากเป็นอันดับสอง กะเหรี่ยงโปว์ในพม่ามักอาศัยอยู่บริเวณที่ราบ แต่กะเหรี่ยงโปว์ในไทยมักอาศัยอยู่บริเวณหมู่บ้านในภูเขาสูง ภาษาพูดของกะเหรี่ยงโปว์ที่ใช้มี 2 ภาษา คือ กะเหรี่ยงโปว์ที่อาศัยอยู่ด้านตะวันตกใช้ภาษากลางของพม่า และกะเหรี่ยงโปว์ที่อาศัยอยู่ด้านตะวันออกใช้ภาษาพม่าและภาษาไทย นอกจากนี้ภาษาเขียนของกะเหรี่ยงโปว์ทั้ง 2 รูปแบบมาจากการดัดแปลงของมิชชันนารีและพระสงฆ์ในศาสนาพุทธ (9)
3. กะเหรี่ยงบะเว (Bwe Karen, *Bway*) อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของรัฐกะเหรี่ยง (Karen State) มักอาศัยในบริเวณหมู่บ้านในภูเขาสูงและที่ราบต่ำ ภาษาเขียนของกะเหรี่ยงบะเว มีมิชชันนารีเป็นผู้ดัดแปลงมาจากตัวอักษรโรมัน (9)
4. กะเหรี่ยงปะโอ (Pa-O) หรือที่เรียกตัวเองว่า ตองสู อาศัยอยู่ที่รัฐฉานทางตอนเหนือของพม่าแต่ในประเทศไทยพบได้น้อย (9)

ชาวกะเหรี่ยงเป็นชนกลุ่มน้อยที่มีศาสนา ภาษา ประเพณีและวัฒนธรรมที่หลากหลายเป็นเอกลักษณ์ของตนเอง ใช้ภาษากะเหรี่ยงซึ่งจัดอยู่ในตระกูลภาษาจีน-ทิเบต (Sino-Tibetan language family) สาขาทิเบต-พม่า (Tibeto-Burman language) เป็นภาษาหลัก การแต่งกายของกะเหรี่ยงแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะที่จำเพาะและแตกต่างกัน ในปัจจุบันมีเพียงกะเหรี่ยงกลุ่มสะกอหรือปากะญอ และกลุ่มโปว์เท่านั้นที่ยังแต่งชุดประจำเผ่าในชีวิตประจำวัน สำหรับกะเหรี่ยงกลุ่มเดียวกันที่อาศัยอยู่คนละพื้นที่ก็ยังมี การแต่งกายที่แตกต่างกัน สังคมของชาวกะเหรี่ยงจะเป็นลักษณะสังคมแบบปิดไม่ค่อยติดต่อสัมพันธ์กับชนเผ่าอื่น นอกจากนี้ชาวกะเหรี่ยงจะไม่นิยมแต่งงานกับชาติพันธุ์อื่นๆ (10) เมื่อดูจากลักษณะทางกายภาพพบว่าชาวกะเหรี่ยงมีลักษณะโครงหน้าคล้ายคลึงกับคนจีนและทิเบต (10) จึงมีการตั้งข้อสันนิษฐานว่าชาวกะเหรี่ยงน่าจะมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ทิเบตหรือประเทศจีน (11) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาหรือหลักฐานใดที่จะอธิบายถึงพันธุศาสตร์ประชากรของชาติพันธุ์กะเหรี่ยง

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 ประชากร

กลุ่มประชากรที่ศึกษาเป็นชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ ที่อาศัยอยู่ที่บ้านแม่สาน ตำบลแม่
ลำ อำเภอศรีสชนาลัย จังหวัดสุโขทัย โดยเก็บตัวอย่างเลือดในระหว่างวันที่ 12-15 ตุลาคม พ.ศ.
2553 ซึ่งวิธีดำเนินการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ COA No. 805|2011RB No. 403/53

3.1.2 ขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากในการวิจัยนี้ข้อมูลที่แสดงเป็นการประมาณร้อยละ ดังนั้นสูตรที่ใช้ในการคำนวณ
ขนาดตัวอย่างคือ

$$n = \frac{NZ^2 / 4}{NE^2 + Z^2 / 4}$$
$$\sim 220 \text{ คน}$$

โดยที่

N	=	จำนวนที่มากที่สุดของประชากรทั้งหมดเท่ากับ 500 คน
Z	=	1.96 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
E	=	ค่าคลาดเคลื่อน = 0.05

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอจำนวน 230 คน
ประกอบด้วยชาย 106 คน และหญิง 124 คน ซึ่งมาจาก 86 ครอบครัว โดยพบจำนวนประชากรที่
ไม่มีความสัมพันธ์กันในระดับเครือญาติ (unrelated individual) จากตัวอย่างทั้งหมดทั้งสิ้น 80
คน เป็นชาย 36 คนและหญิง 44 คน

3.2 การเก็บตัวอย่าง

3.2.1 การสัมภาษณ์กลุ่มประชากร

ผู้วิจัยและเจ้าหน้าที่อาสาสมัครหมู่บ้าน (อสม.) ช่วยเป็นล่ามสัมภาษณ์และเป็นผู้กรอก
ข้อมูลการสัมภาษณ์ตามแบบสัมภาษณ์ที่จัดเตรียมไว้ โดยทางผู้วิจัยได้ทำความเข้าใจกับล่ามและ
มีพยานรับรู้เพื่อยืนยันความถูกต้องของข้อมูลที่ได้รับรวมถึงข้อมูลที่อาสาสมัครได้รับ หลังจากนั้น
ให้อาสาสมัครที่ยินดีเข้าร่วมโครงการวิจัยลงลายมือชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ หรือประทับ

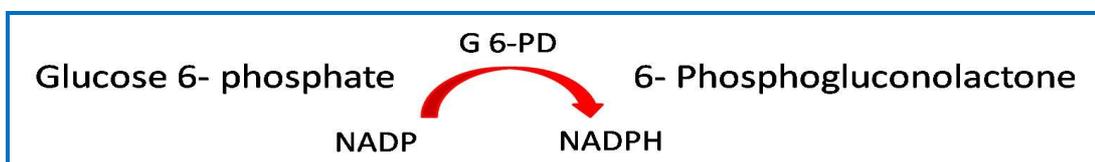
ลายนิ้วมือในกรณีที่ไม่สามารถเขียนหนังสือได้ ซึ่งข้อมูลที่สำคัญได้แก่ อายุ เพศ เชื้อชาติ สัญชาติ ที่อยู่ และประวัติครอบครัว ในการวิจัยจะใช้รหัสประจำโครงการวิจัยเพื่อแสดงตัวอาสาสมัคร ทั้งนี้ข้อมูลส่วนบุคคลของอาสาสมัครทั้งหมดจะถูกเก็บไว้เป็นความลับและจะเปิดเผยเฉพาะข้อมูลที่ได้รับการวิเคราะห์แล้วเท่านั้น

3.2.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดบริเวณต้นแขนจากอาสาสมัครชาวกระเหรี่ยงทั้งเพศชายและหญิงที่ได้รับการสัมภาษณ์แล้ว โดยเจาะเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร (มล.) แล้วแบ่งออกเป็น 2 หลอด คือ Acid citrate dextrose (ACD) จำนวน 3 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และหลอด Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) จำนวน 2 มล. สำหรับศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3 การคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เชิงคุณภาพวิเคราะห์โดยใช้ G 6-PD Test Kit (Fluorescence spot test)

หลักการคือ วัดปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ในการเปลี่ยน NADP เป็น NADPH แสดงดังภาพที่ 3.1 ซึ่ง NADPH มีคุณสมบัติเรืองแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 460 nm เมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแสง ultraviolet (UV) ความยาวคลื่นยาว (long-wave ultraviolet light) การวิเคราะห์ผลจะวิเคราะห์ตามระดับการเรืองแสง โดยถ้าผลที่ได้เรืองแสงมาก แสดงว่า เอนไซม์ G 6-PD ทำงานได้ตามปกติ (normal) หากมีการเรืองแสงน้อยแสดงว่า เอนไซม์ G 6-PD ทำงานได้ในระดับปานกลาง (intermediate) และหากเรืองแสงน้อยมากหรือไม่เรืองแสงแสดงว่า พร่องเอนไซม์ G 6-PD (deficiency)



ภาพที่ 3.1 แสดงปฏิกิริยาการเกิด NADPH ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

การตรวจใช้น้ำยา R&D DIAGNOSTICS® G-6-PD Catalog No. SQMMR500 (R&D DIAGNOSTICS) การเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจจำนวน 50 ตัวอย่าง ทำโดยละลายผง Reagent code RD7002 (1mmol/l glucose 6-phosphate, 0.75 mmol/l NADP, 0.8 mmol/l GSSG

(oxidized glutathione), 0.2% saponin และ 225 mmol/l pH 7.8 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane) ใน Elution/Dilution buffer (Code RD7001) ปริมาตร 5 ml จากนั้นแบ่งสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml จำนวน 5 หลอด เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 เดือนหรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ได้นาน 2 เดือน

ในการตรวจวัดจะนำตัวอย่างเลือด (whole blood) ที่เก็บในหลอด ACD 5 µl มาผสมกับน้ำยาที่เตรียมไว้แล้วปริมาตร 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารผสมออกมา 10 µl หยดบน filter paper ที่ระบุเลขที่ตัวอย่างเลือด ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงรอให้กระดาษแห้ง จากนั้นนำ filter paper ส่องภายใต้คลื่นแสง ultraviolet (UV) ความยาวคลื่นช่วง 460 nm บันทึกผลการเรืองแสงที่เกิดขึ้น โดยให้สัญลักษณ์ N แสดงถึงมีการเรืองแสงมาก เอนไซม์ G 6-PD ทำงานได้ตามปกติ ให้สัญลักษณ์ I แสดงถึงมีการเรืองแสงน้อย เอนไซม์ G 6-PD ทำงานได้ในระดับปานกลาง ให้สัญลักษณ์ D แสดงถึงมีการเรืองแสงน้อยมากหรือไม่มีการเรืองแสง ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (deficiency)

3.4 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol chloroform

นำตัวอย่างเลือดที่เก็บในหลอด EDTA มาทำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงออกด้วย Lysis buffer ปริมาตร 10 ml (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)) นำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ความเร็ว 1,000 g อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที ทิ้งส่วนใสและเก็บตะกอนไว้ จากนั้นปั่นล้างตะกอนที่ได้ด้วย Lysis buffer อีก 5 ml ที่ความเร็ว 1,000 g อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที ถ้าหากสารละลายมีสีแดงคล้ำให้ล้างตะกอนด้วย Lysis buffer อีกครั้งจนสุดทำได้ตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่สะอาด

ทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใส่ SE buffer ปริมาตร 1 ml (0.075 M NaCl (UNIVAR), 0.024 M EDTA pH 8.0 (Plusone[®] Amersham Biosciences)) Proteinase K digestion buffer ปริมาตร 4 ml (27% sucrose (USB), 1X SSC, 1 mM EDTA (Plusone[®] Amersham Biosciences), 1% SDS (GE Healthcare)) และ 20 mg/ml Proteinase K (Amresco) ปริมาตร 150 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นใส่ phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 5 ml เขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที-2 ชั่วโมง นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 rpm 10 นาที เพื่อแยกโปรตีนออกจากชั้น DNA จากนั้นดูสารละลายชั้นบน (DNA) มาตกตะกอนด้วย isopropanol (MERCK) โดยใส่เท่ากับ

ปริมาณของสารละลายที่ดูตม กลับหลอดไปมาเบาๆ รอให้ตะกอน DNA ตกลงมาที่ก้นหลอด ถ้า มองไม่เห็นตะกอนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็น เวลา 30 นาที ถ้ามองเห็นตะกอนที่ก้นหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บ ตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 4,000 rpm 10 นาทีดูต เหาสารละลายออก ปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วย 1X TE buffer ปริมาตร 100-200 μ l วัดปริมาณ DNA ที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง Nano drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) และปรับความเข้มข้นของ DNA ในแต่ละตัวอย่างให้มี ความเข้มข้น 50 ng/ μ l ด้วย 1X TE buffer เก็บสารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับใช้ ศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ต่อไป

3.5 การศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ด้วยวิธี

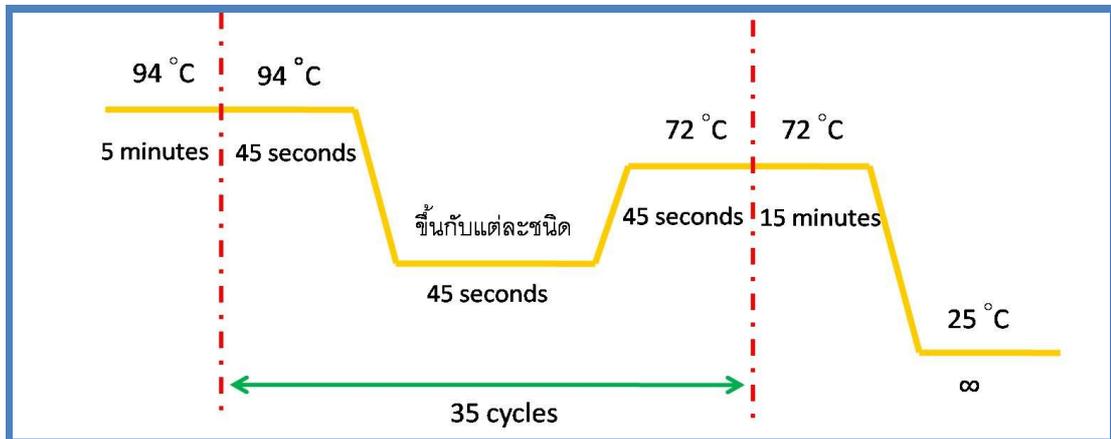
Polymerase chain reaction–Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

นำ DNA ของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่สกัดด้วยวิธี phenol chloroform มาศึกษาการ กลายพันธุ์ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่มีการออกแบบไว้แล้วในการศึกษาก่อน หน้านี้ (90) และอาศัยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อตรวจสอบการ กลายพันธุ์ เบื้องต้นตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดที่พบบ่อยในชาวพม่า และมอญคือ *G6PD* Mahidol (487G \rightarrow A) หากตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ดังกล่าวจะตรวจการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยใน ภูมิภาคนี้อีก 7 ชนิด ได้แก่ *G6PD* Viangchan (871G \rightarrow A), *G6PD* Union (1,360C \rightarrow T), *G6PD* Canton (1,376G \rightarrow T), *G6PD* Kaiping (1,388G \rightarrow A), *G6PD* Chinese-4 (392G \rightarrow T), *G6PD* Coimbra (592C \rightarrow T) และ *G6PD* Chinese-5 (1,024C \rightarrow T) และศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *G6PD* ทั้ง 2 ตำแหน่ง ได้แก่ nt1,311C \rightarrow T และ nt93T \rightarrow C ใน DNA ของผู้ที่พร่องและไม่พร่อง เอนไซม์ G 6-PD โดยตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของ PCR-RFLP ด้วยการใส่ 8-12% polyacrylamide gel electrophoresis สำหรับตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* จะ ทำ Direct sequencing ต่อไป

3.5.1 ขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม PCR ปริมาตร 20 μ l โดยให้ปฏิกิริยาสุดท้ายมีความเข้มข้นของ Master mix ดังนี้ 1X PCR buffer (RBC Bioscience), 0.5 U Taq polymerase (RBC Bioscience), 20 ng forward primer (Biolabs), 20 ng reverse primer (Biolabs), 1.5 mM MgCl_2 (RBC Bioscience), 200 μ M dNTPs (RBC Bioscience), และ 50 ng/ μ l DNA template ซึ่งสถานะที่

เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ของแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 3.2 Primer และ Annealing temperature ที่ใช้ในการทำ PCR แต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 3.1



ภาพที่ 3.2 แสดงสถานะที่เหมาะสมในการทำ PCR สำหรับศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แต่ละชนิด

ตารางที่ 3.1 แสดง Primer และ Annealing temperature ที่ใช้ในการทำ PCR แต่ละชนิด

G6PD Mutations	Primer	Sequence	Annealing temperature (°C)
G6PD Mahidol	487F	5'-GCGTCTGAATGATGCAGCTCTGAT-3'	56
	487R	5'-CTCCACGATGATGCGGTTCAAGC-3'	
G6PD Viangchan	871F	5'-TGGCTTTCTCTCAGGTCTAG-3'	60
	9R	5'-GTCGTCCAGGTACCCTTTGGGG-3'	
G6PD Union	1,360F	5'-ACGTGAAGCTCCCTGACGC-3'	65
	1,360R	5'-GTGAAAATACGCCAGGCCTTA-3'	
G6PD Canton	1,376F	5'-ACGTGAAGCTCCCTGACGC-3'	65
	1,376R	5'-GTGAAAATACGCCAGGCCTTA-3'	
G6PD Kaiping	1,388F	5'-ACGTGAAGCTCCCTGACGC-3'	65
	1,388R	5'-GTGCAGCAGTGGGGTGAACATA-3'	
G6PD Chinese-4	392F	5'GGACTCAAAGAGAGGGGCTG-3'	65
	392R	5'-GAAGAGGCGGTTGGCCGGTGAC-3'	
G6PD Coimbra	592F	5'-GAGGAGGTTCTGGCCTCTACTC-3'	65
	592R	5'-TTGCCCAGGTAGTGGTCGCTGC-3'	
G6PD Chinese-5	1,024F	5'-GTCAAGGTGTTGAAATGCATC-3'	65
	1,024R	5'-CATCCCACCTCTCATTCTCC-3'	
nt 1,311 (rs2230037)	R3F	5'-TGTTCTTCAACCCCGAGGAGT-3'	67
	R3MD	5'-AAGACGTCCAGGATGAGGTGATC-3'	
nt 93 (rs2071429)	1,360F	5'-ACGTGAAGCTCCCTGACGC-3'	70
	1,360R	5'-GTGAAAATACGCCAGGCCTTA-3'	

3.5.2 ขั้นตอน Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

โดยนำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ Master mix ที่ประกอบด้วย 1U restriction enzyme (Fermentas), 1X reaction buffer (Fermentas) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclaved) ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 20 µl ปั่นปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C และ 55°C ตามสภาพการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงชนิดของRestriction enzymes ชนิดของBuffers ตำแหน่งเบสที่ตัด Product sizes ที่ตัดได้ รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ RFLP

G6PD Mutations	Restriction Enzymes	Buffers (B-Name)	ตำแหน่งที่ตัด	Product sizes (bp)	อุณหภูมิ (°C)
G6PD Mahidol	<i>HindIII</i>	B-R	5'-A [↓] AGCTT-3' 3'-TTCGA [↑] A-5'	N 104 M 82 + 22	37
G6PD Viangchan	<i>XbaI</i>	B-Tango	5'-T [↓] CTAGA-3' 3'-AGATC [↑] T-5'	N 126 M 106+20	37
G6PD Union	<i>HhaI</i>	B-Tango	5'-GCG [↓] C-3' 3'-C [↑] GCG-5'	N 142+45+27 M 187+27	37
G6PD Canton	<i>AflII</i>	B-O	5'-C [↓] TTAAG-3' 3'-GAATT [↑] C-5'	N 214 M 194+20	37
G6PD Kaiping	<i>NdeI</i>	B-O	5'-CA [↓] TATG-3' 3'-GTAT [↑] AC-5'	N 227 M 206+21	37
G6PD Chinese-4	<i>BstEII</i>	B-O	5'-G [↓] GTNACC-3' 3'-CCANTG [↑] G-5'	N 188+15 M 203	37
G6PD Coimbra	<i>PstI</i>	B-O	5'-CTGCA [↓] G-3' 3'-G [↑] ACGTC-5'	N 157+83 M 157+63+20	37
G6PD Chinese-5	<i>MboII</i>	B-B	5'-GAAGA(N) ₈ [↓] -3' 3'-CTTCT(N) ₇ [↑] -5'	N187 M150+37	37
nt 1,311 rs2230037	<i>BclI</i>	B-G	5'-T [↓] GATCA-3' 3'-ACTAG [↑] T-5'	N 207 M 184+23	55
nt 93 rs2071429	<i>NlaIII</i>	B-G	5'-CATG [↓] -3' 3'- [↑] GTAC-5'	N 214 M 172 +42	37

หมายเหตุ B- หมายถึง Buffer N หมายถึง Normal และ M หมายถึง Mutation

3.5.3 Gel electrophoresis

นำ PCR-RFLP ที่เกิดขึ้นมาตรวจสอบผลโดยใช้วิธี gel electrophoresis ในที่นี้จะใช้ 8-12% polyacrylamide gel (29% acrylamide + 1% N,N' methylenebisacrylamide (Bio-RAD), (10X) TBE buffer (Bio-RAD), 10% ammonium persulfate (Pharmacia Biotech), TEMED (Bio-RAD) และน้ำกลั่น) (91) เป็นตัวกลางในการดูผลการกลายพันธุ์และโพลีมอร์ฟิซึมที่

เกิดขึ้น เนื่องจาก polyacrylamide gel สามารถแยกขนาดชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกต่างกันได้ ประมาณ 20 bp หลังจากที่เราเจลแล้ว ผสม PCR-PFLP product ปริมาตร 5 μ l กับ 6x loading buffer (RBC Bioscience) ปริมาตร 0.83 μ l จากนั้นโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงเจล โดยใช้ความต่าง ศักย์ 75 โวลต์เป็นเวลา 75 นาที สำหรับ 8% polyacrylamide gel และ 75 โวลต์ 140-180 นาที สำหรับ 12% polyacrylamide gel และย้อมเจลที่ได้ด้วย Ethidium bromide (Promega) ประมาณ 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า 3 นาที นำเจลไปถ่ายรูปรูปด้วยเครื่อง Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR⁺ with Image Lab[™] Software บันทึกผลที่เกิดขึ้น และถ่ายรูปรูปบันทึกไว้

3.6 การศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ด้วยวิธี Direct Sequencing

นำ DNA ของตัวอย่างที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ทั้ง 8 ชนิด มาศึกษาด้วยวิธี Direct Sequencing ใน exon ที่ 2-13 เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการแปรหัสเป็นกรดอะมิโน ในที่นี้จะเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของแต่ละ exon ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่มีการออกแบบไว้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (90, 92) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit Cat No.YDF300 Lot.No.PG-913-09362 (RBC Bioscience) หลังจากนั้นวัดความเข้มข้นของ purified DNA ที่ได้ก่อนส่ง sequence ต่อไป

3.6.1 ขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม PCR ปริมาตร 50 μ l โดยให้ปฏิกิริยาสุดท้ายมีความเข้มข้นของ Master mix ดังนี้ 1X PCR buffer (RBC Bioscience), 0.5-1.5 U Taq polymerase (RBC Bioscience), 20 ng หรือ 0.4 μ M forward primer (Biolabs, Bio Basic Inc), 20 ng หรือ 0.4 μ M reverse primer (Biolabs, Bio Basic Inc), 1.0-2.5 mM $MgCl_2$ (RBC Bioscience), 0.20-0.25 mM dNTPs (RBC Bioscience), และ 50 ng/ μ l DNA template ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของ Master mix ที่ทำ PCR แต่ละ exon และสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR แสดงดังตารางที่ 3.3-3.4 สำหรับ primer และ product size ของแต่ละ exon แสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มข้นสุดท้ายของ Master mix ในการทำ PCR แต่ละ exon

Reagent	ความเข้มข้นสุดท้ายของ Master mix ในแต่ละ exon									
	2	3-4	5	6-7	8	9-10	11	12	13	
(10x) PCR buffer	1X									
10 mM dNTPs	0.2mM	0.25mM	0.2mM	0.25mM	0.2mM					
50 mM MgCl ₂	1.5mM	1.0mM	1.0mM	2.5mM	1.0mM					
5U/μl Taq polymerase	0.5U	1.5U	0.5U	1.5U	0.5U					
Forward primer	20 ng	0.4μM				20ng	0.4μM			
Reverse primer	20 ng	0.4μM				0.4μM	20ng	0.4μM		

ตารางที่ 3.4 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ของแต่ละ exon

Steps	exon 2	exon 3-4	exon 5	exon 6-7	exon 8
Pre-denaturation	94 °C, 5 minutes				
Denaturation	94 °C, 45 seconds	94 °C, 30 seconds	94 °C, 45 seconds		
Annealing	60 °C, 45 seconds	62 °C, 30 seconds	65 °C, 45 seconds	67 °C, 45 seconds	65 °C, 45 seconds
Extension	72 °C, 45 seconds	72 °C, 1 minute	72 °C, 45 seconds		
Cycles	35	40	35		
Post-extension	72 °C, 15 minutes	72 °C, 10 minutes	72 °C, 15 minutes		
Steps	exon 9-10		exon 11	exon 12	exon 13
Pre-denaturation	94 °C, 5 minutes				
Denaturation	94 °C, 45 seconds				
Annealing	65 °C, 45 seconds				67 °C, 45 seconds
Extension	72 °C, 45 seconds				
Cycles	35				
Post-extension	72 °C, 15 minutes				

ตารางที่ 3.5 แสดง primer และ product size ของแต่ละ exon

Exon	Primer	Sequence	Product size (bp)
2	G6P2F	5'-CTCTAGAAAGGGGCTAACTTCTCAA-3'	241
	G6P2R	5'-GGAATTCCTGGCTTTTAAGATTGGG-3'	
3-4	G6PD_ Ex3-4F	5'-TGTCCCCAGCCACTTCTAA-3'	400
	G6PD_ Ex3-4R	5'-GGAGAGGAGGAGAGCATCC-3'	
5	Ex5F	5'-GTGTGTCTGTCTGTCCGTGTC-3'	320
	Ex5R	5'-CACGCTCATAGAGTGGTGGG-3'	
6-7	G6PD_ Ex6-7F	5'-ACACAAGGCACGGGAGGT-3'	697
	G6PD_ Ex6-7R	5'-GAGGAGCTCCCCAAGATAG-3'	
8	Ex8F	5'-CATGCCCTTGAACCAGGTGA-3'	241
	Ex8R	5'-GCATGCACACCCCAGCTC-3'	
9-10	Ex9F	5'-TTCTCTCCCTTGGCTTCTC-3'	612
	Ex10R	5'-CACACTGCTCCTTCTCTGTA-3'	
11	G6P10F	5'-GAAGCCGGGCATGTTCTTCAAC-3'	389
	1360R	5'-GTGAAAATACGCCAGGCCTTA-3'	
12	1360F	5'-ACGTGAAGCTCCCTGACGC-3'	469
	G6P13R	5'-CCAGGGCTCAGAGCTTGTG-3'	
13	Ex13F	5'-TGCCTCTCCTCCACCCGTCA-3'	206
	Ex13R	5'-GTCAATGGTCCCGGAGTC-3'	

หมายเหตุ F คือ Forward primer และ R คือ Reverse primer

3.6.2 Gel electrophoresis

หลังจากที่เจลเซ็ทตัวแล้วเตรียม PCR product ปริมาตร 5 μ l กับ 6x loading buffer (RBC Bioscience) ปริมาตร 0.83 μ l จากนั้นโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงเจล Run gel โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (Promega) ประมาณ 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า 3 นาที นำเจลไปถ่ายรูปลด้วยเครื่อง Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR⁺ with Image Lab[™] Software บันทึกผลที่เกิดขึ้น และถ่ายรูปลบันทึกไว้ สำหรับ PCR ที่ได้ band ที่ต้องการเพียง band เดียวเท่านั้น และไม่พบ non-specific band ใดๆจึงนำ PCR-product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield PCR DNA Fragments Extraction Kit แต่สำหรับ PCR ที่มี non-specific band โหลดตัวอย่างทั้งหมดที่ผสม 6x loading buffer ลงเจล Run gel โดยใช้โวลต์และ

เวลาเหมือนข้างต้น จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide (Promega) ประมาณ 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า 3 นาที นำเจลไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR⁺ with Image Lab[™] Software บันทึกผลที่เกิดขึ้นและตัดเจลเฉพาะส่วนที่มี Product size ที่ต้องการ นำเจลส่วนนี้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield Gel Fragments Extraction Kit

3.6.3 การทำ PCR Product และ Gel fragments ให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience Cat No. YDF300 Lot No. PG-913-09362)

3.6.3.1 การทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์

ใส่ DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของ PCR-product ลงผสมกับ PCR-product ให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดผสมใส่ DF column ใน Collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที ทิ้งสารละลายส่วนล่าง ใส่ Wash buffer 600 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที ทิ้งสารละลายส่วนล่าง ปั่นอีกครั้งที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดสารละลายให้หมด จากนั้นนำ Column ไปใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ ปิดฝา Elution buffer ประมาณ 25-30 μ l ลงไปที่กลาง Column ทิ้งไว้ 2-4 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์

3.6.3.2 การทำ Gel fragments ให้บริสุทธิ์

ตัดเนื้อเจลให้มีน้ำหนักประมาณ 300 mg จากข้อ 3.6.2 เป็นชิ้นเล็กๆใส่ใน microcentrifuge tube ปิดฝา DF buffer ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10-15 นาที กลับหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที เมื่อเจลละลายหมดแล้ว ปิดฝาหลอดผสมใส่ DF column ใน Collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที ทิ้งสารละลายส่วนล่าง หากสารผสมข้างต้นมีปริมาณมากกว่า 800 μ l ให้ปิดฝาหลอดที่เหลือใส่ Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อีก 30 วินาที ทิ้งสารละลายส่วนล่าง จากนั้นเปิด Wash buffer 600 μ l ใส่ลงใน Column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที ทิ้งสารละลายส่วนล่าง ล้างด้วย Wash buffer อีก 600 μ l จากนั้นปั่นแห้งที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง นำ Column ใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นเปิด Elution buffer ประมาณ 25-30 μ l ลงไปที่กลาง Column ทิ้งไว้ 2-4 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จะได้ Purified DNA หลังจากนั้นนำ Purified DNA ทั้งหมดไปวัดความเข้มข้น DNA โดยใช้ Nano drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) ก่อนส่ง sequence

3.6.4 การวิเคราะห์ผล DNA Sequencing

นำ DNA sequence ของแต่ละ exon มาวิเคราะห์ลำดับเบสที่แตกต่างจากฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.9.0 ร่วมกับจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *G6PD* ในมนุษย์รหัส Genbank คือ X55448.1

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

3.7.1 วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไป

วิเคราะห์จำนวนเพศชายและหญิงจากตัวอย่างที่เก็บได้ พร้อมทั้งวิเคราะห์อายุ เป็นค่าเฉลี่ย และช่วงอายุของเพศชาย หญิง และของตัวอย่างทั้งหมด

3.7.2 วิเคราะห์ข้อมูลฟีโนไทป์

วิเคราะห์ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และพาหะของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทั้งในเพศชายและหญิง

3.7.3 วิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์

คำนวณความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) และความถี่อัลลีล (allele frequency) ของการกลายพันธุ์ และ SNPs พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของจีโนไทป์ว่าเป็นไปตามทฤษฎี Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) จากนั้นวิเคราะห์ haplotype ของ SNPs ที่เกิดขึ้นบนอัลลีล *G6PD* Mahidol *G6PD* Canton และอัลลีลปกติ (*G6PD* B)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

เก็บตัวอย่างเลือดของชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ ที่อาศัยอยู่ที่บ้านแม่सान ตำบลแม่ส้า อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดสุโขทัยจำนวน 230 คน ซึ่งมาจาก 86 ครอบครัว แบ่งเป็นชาย 106 คน คิดเป็นร้อยละ 46.09 ของตัวอย่างทั้งหมด และหญิง 124 คน คิดเป็นร้อยละ 53.91 ของตัวอย่างทั้งหมด อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงของประชากรกลุ่มนี้ประมาณ 5 : 6 ประชากรที่ศึกษามีอายุอยู่ในช่วง 5-86 ปี ส่วนใหญ่มีอายุ 42 ปี และมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 35 ปี นอกจากนี้จากการวิเคราะห์พงศาวรีของครอบครัวของตัวอย่างทั้งหมดพบจำนวนประชากรที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (unrelated individual) เท่ากับ 80 คน โดยแบ่งเป็นชาย 36 คนคิดเป็นร้อยละ 45 และหญิง 44 คนคิดเป็นร้อยละ 55 อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงของกลุ่ม unrelated individual ประมาณ 4 : 5

ชาวกะเหรี่ยงปากะญอกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในหมู่บ้านบนภูเขาสูง ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก เช่น ทำนา ทำไร่ และเลี้ยงสัตว์ภายในครัวเรือน แต่มีชาวบ้านบางส่วนที่เข้าไปทำงานในเมือง ชาวบ้านส่วนใหญ่แต่งกายเหมือนคนเมืองทั่วไป แต่มีคนบางส่วนที่ยังคงแต่งกายด้วยชุดพื้นเมือง แสดงดังภาพที่ 4.1 การสื่อสารกันภายในหมู่บ้านสื่อสารกันด้วยภาษากะเหรี่ยง นอกจากนี้ จากการสัมภาษณ์และเก็บข้อมูลแสดงดังภาพที่ 4.2 พบว่าชาวบ้านส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 95 ใช้นามสกุลเดียวกันเนื่องจากการแต่งงานกันเองภายในหมู่บ้านและไม่นิยมแต่งงานกับคนภายนอก แต่มีชาวบ้านบางส่วนที่แต่งงานกับคนภายนอกหมู่บ้านและเปลี่ยนไปใช้นามสกุลอื่นเช่น คนไทยในจังหวัดลำปางซึ่งเป็นบริเวณใกล้เคียง



ภาพที่ 4.1 แสดงชุดพื้นเมืองของชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ



ภาพที่ 4.2 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดของชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

4.2 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

จากการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอทั้งหมด 230 คน (ชาย 106 คนและหญิง 124 คน) ด้วยวิธี Fluorescence spot test ซึ่งอาศัยการเรืองแสงของ NADPH ที่ 460 nm เมื่อถูกกระตุ้นด้วย UV ความยาวคลื่นยาว และบันทึกผลจากระดับการเรืองแสงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ด้วย Fluorescence spot test โดย D หมายถึง ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD I หมายถึง พาหะ และ N หมายถึง ปกติ

ผลการทดลองพบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จำนวน 20 คน เป็นเพศชาย 15 คนคิดเป็นร้อยละ 14.15 และเพศหญิง 5 คนคิดเป็นร้อยละ 4.03 นอกจากนี้ยังพบกลุ่ม intermediate 27 คน เป็นเพศชาย 8 คนคิดเป็นร้อยละ 7.55 และเพศหญิง 19 คนคิดเป็นร้อยละ 15.32

สำหรับการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดทั้งหมด 80 คน (ชาย 36 คนและหญิง 44 คน) พบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทั้งหมด 10 คน โดยเป็นชาย 9 คนคิดเป็นร้อยละ 25 และหญิง 1 คนคิดเป็นร้อยละ 2.27 และพบกลุ่ม intermediate

9 คน เป็นชาย 3 คนคิดเป็นร้อยละ 8.33 และเป็นหญิง 6 คนคิดเป็นร้อยละ 13.64 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยใช้ Fluorescence spot test ในตัวอย่างทั้งหมด และกลุ่ม Unrelated individual

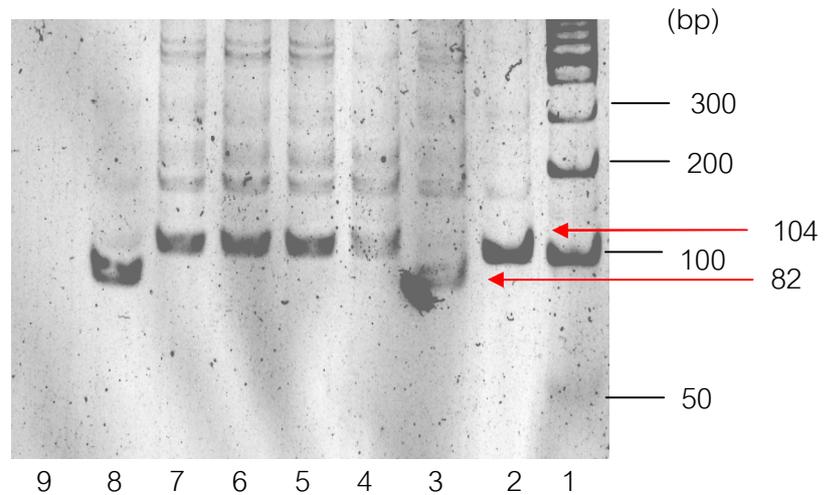
สถานะ	ประชากรทั้งหมด			Unrelated individual		
	ชาย(%)	หญิง(%)	ทั้งหมด(%)	ชาย(%)	หญิง(%)	ทั้งหมด(%)
พร่องเอนไซม์ G 6-PD	15 (14.15)	5 (4.03)	20 (8.7)	9 (25)	1(2.27)	10 (12.5)
Intermediate	8(7.55)	19 (15.32)	27 (11.74)	3 (8.33)	6 (13.64)	9 (11.25)
ปกติ	83 (78.30)	100 (80.65)	183 (79.56)	24(66.67)	37 (84.09)	61(76.25)
ทั้งหมด	106 (100)	124 (100)	230 (100)	36 (100)	44 (100)	80 (100)

4.3 การกลายพันธุ์ของยีน G6PD ในกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

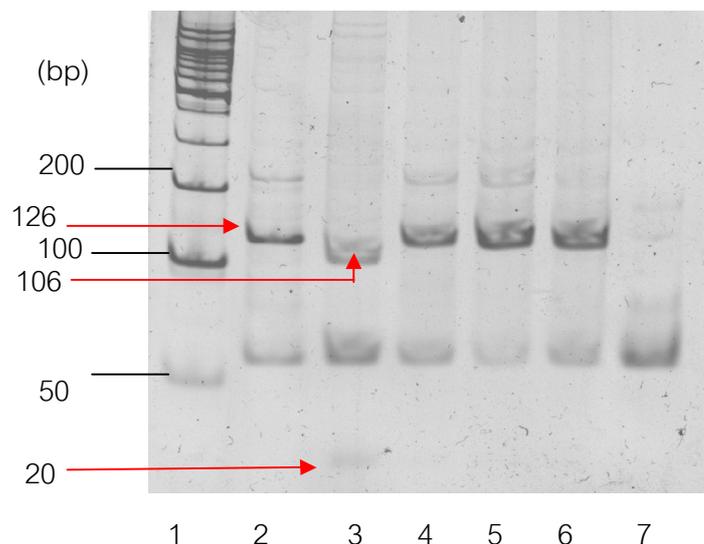
จากการนำ DNA ของผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทั้งหมด 20 คน พร้อมด้วยกลุ่ม intermediate 27 คน มาศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ได้แก่ G6PD Mahidol^{487A}, G6PD Viangchan^{871A}, G6PD Union^{1,360T}, G6PD Canton^{1,376T}, G6PD Kaiping^{1,388A}, G6PD Chinese-4^{392T}, G6PD Coimbra^{592T} และ G6PD Chinese-5^{1,024T} ด้วยวิธี PCR-RFLP ตามด้วย 8-12% polyacrylamide gel electrophoresis และทำ Direct sequencing สำหรับตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์

4.3.1 การกลายพันธุ์ของยีน G6PD จากการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ทั้ง 8 ชนิดในกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD และกลุ่ม intermediate ทั้งหมด 47 คน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.4 -4.11

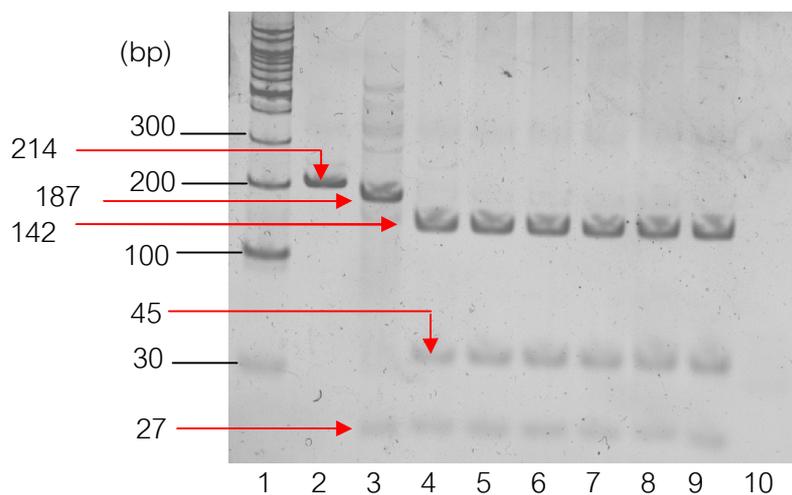


ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ได้ใส่ เอนไซม์ *Hind*III มีขนาด 104 bp Lane 3 คือ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} เมื่อถูกตัดด้วย *Hind*III มีขนาด 82 และ 22 bp (positive control) Lane 4-7 คือ ตัวอย่างที่ไม่พบ การกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} มีขนาด 104 bp (normal) Lane 8 คือ ตัวอย่างที่พบการ กลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} เมื่อถูกตัดด้วย *Hind*III มีขนาด 82 และ 22 bp และ Lane 9 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Mahidol^{487A})

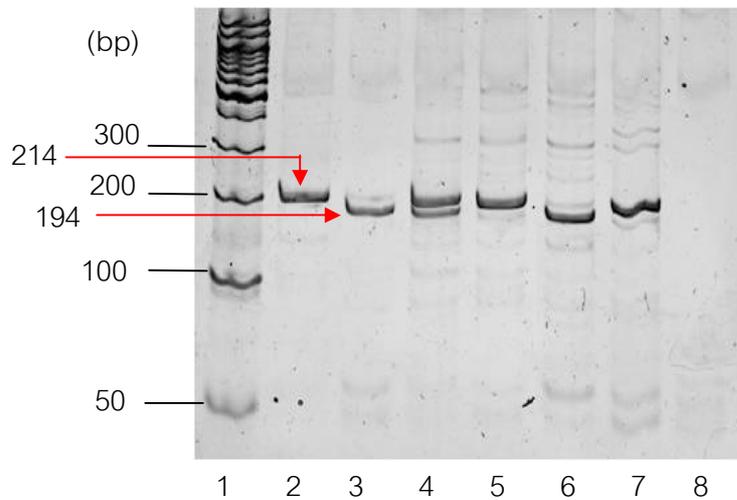


ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan^{871A} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I ใน Lane ที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ได้ใส่ เอนไซม์ *Xba*I มีขนาด 126 bp Lane 3 คือ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan^{871A}

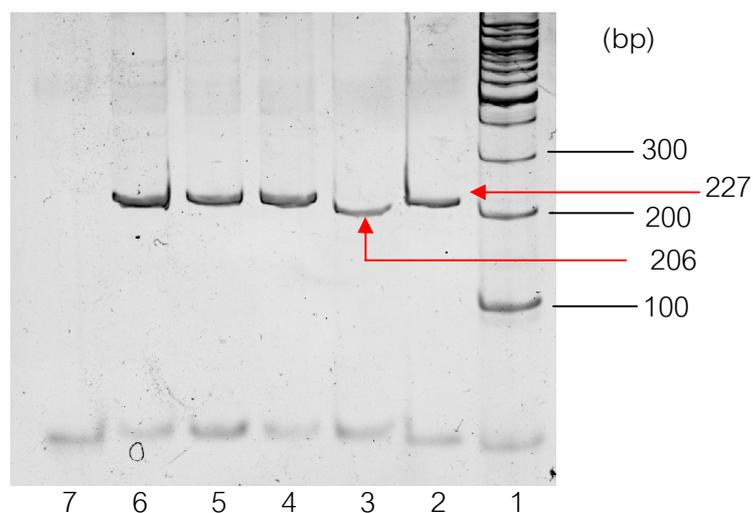
แบบ homozygote ถูกตัดด้วย *Xba*I มีขนาด 106 และ 20 bp (positive control) Lane4-6 คือ ตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan^{871A} เมื่อตัดด้วย *Xba*I มีขนาด 126 bp (normal) และ Lane 7 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Viangchan^{871A})



ภาพที่ 4.6 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Union^{1,360T} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I ใน Lane ที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ *Hha*I มีขนาด 214 bp Lane 3 คือ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Union^{1,360T} แบบ homozygote ถูกตัดด้วย *Hha*I มีขนาด 187 และ 27 bp (positive control) Lane4-9 คือ ตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Union^{1,360T} เมื่อตัดด้วย *Hha*I มีขนาด 142 45 และ 27 bp (normal) และ Lane 10 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Union^{1,360T})

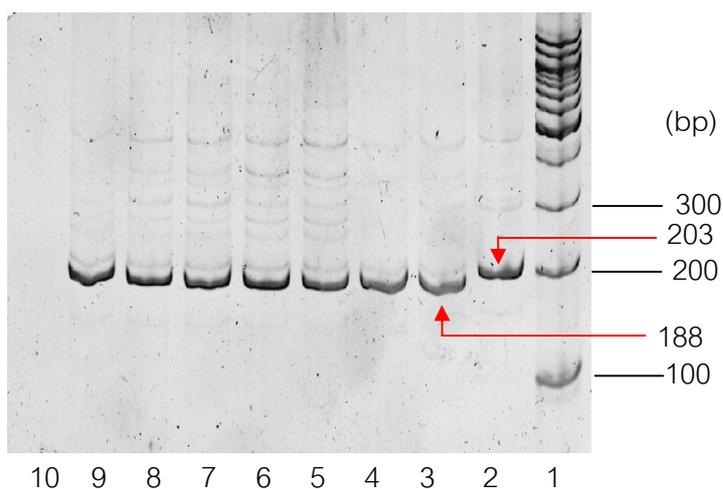


ภาพที่ 4.7 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Af*III ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ *Af*III มีขนาด 214 bp Lane 3 คือ DNA ที่มีกรกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} แบบ homozygote ถูกตัดด้วย *Af*III มีขนาด 194 และ 20 bp (positive control) Lane 4 คือ DNA ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} แบบ heterozygote ถูกตัดด้วย *Af*III มีขนาด 214, 194 และ 20 bp Lane 5 และ 7 คือ ตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} เมื่อตัดด้วย *Af*III มีขนาด 214 bp (normal) Lane 6 คือ ตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} แบบ hemizygote เมื่อถูกตัดด้วย *Af*III มีขนาด 194 และ 20 bp และ Lane 8 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Canton^{1,376T})

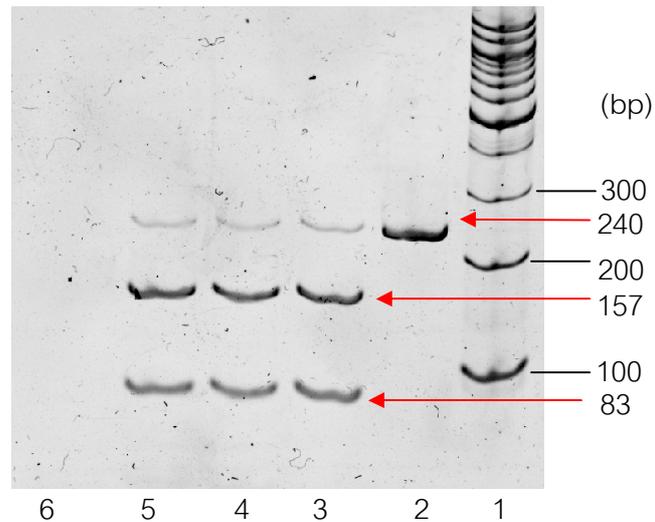


ภาพที่ 4.8 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping^{1,388A} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ *Nde*I

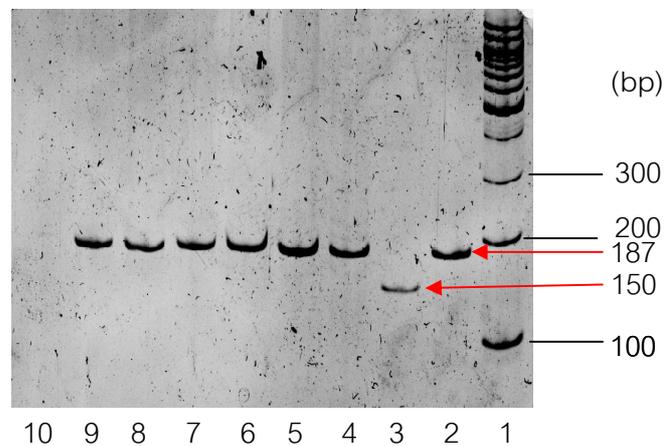
มีขนาด 227 bp Lane 3 คือ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping^{1,388A} แบบ homozygote ถูกตัดด้วย *NdeI* มีขนาด 206 และ 21 bp (positive control) Lane 4-6 คือ ตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping^{1,388A} เมื่อตัดด้วย *NdeI* มีขนาด 227 bp (normal) และ Lane 7 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Kaiping^{1,388A})



ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-4^{392T} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstEII* ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-4^{392T} แบบ homozygote ไม่ถูกตัดด้วย *BstEII* มีขนาด 203 bp (positive control) Lane 3-9 คือ DNA ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-4^{392T} เมื่อถูกตัดด้วย *BstEII* มีขนาด 188 และ 15 bp (normal) และ Lane 10 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Chinese-4^{392T})



ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Coimbra^{592T} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Coimbra^{592T} ไม่ถูกตัดด้วย *Pst*I มีขนาด 240 (157 + 83) bp (positive control) Lane 3-5 คือ DNA ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Coimbra^{592T} เมื่อถูกตัดด้วย *Pst*I มีขนาด 157 และ 83 bp (normal) และ Lane 6 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Coimbra^{592T})



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-5^{1,024T} ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*II ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 DNA ที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ *Mbo*II มีขนาด 187 bp Lane 3 คือ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-5^{1,024T} เมื่อถูกตัดด้วย *Mbo*II มีขนาด 150 และ 37 bp (positive control) Lane 4-9 คือ ตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Chinese-5^{1,024T} มีขนาด 187 bp (normal) และ Lane 10 คือ H₂O (negative control ของ G6PD Chinese-5^{1,024T})

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ทั้ง 8 ชนิดของยีน *G6PD* ด้วยวิธี PCR-RFLP ในกลุ่มที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และกลุ่ม intermediate รวมทั้งหมด 47 คน (ชาย 23 คนและหญิง 24 คน) พบการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol*^{487A} มากที่สุดจำนวน 32 คน คิดเป็นร้อยละ 68.09 โดยเป็น hemizygote 15 คนจากชายทั้งหมด 23 คน คิดเป็นร้อยละ 65.22 heterozygote 17คน จากหญิง 24 คน คิดเป็นร้อยละ 70.83 นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Canton*^{1,376T} จำนวน 4 คน คิดเป็นร้อยละ 8.51 โดยเป็น hemizygote 1 คนจากชาย 23 คน คิดเป็นร้อยละ 4.35 และ heterozygote 3 คน จากหญิง 24 คน คิดเป็นร้อยละ 12.5 และมีตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ทั้ง 8 ชนิดจากวิธี PCR-RFLP จำนวน 11 คน โดยเป็น กลุ่มพร่องเอนไซม์ G 6-PD 1 คน และ กลุ่ม intermediate 10 คน แสดงดังตารางที่ 4.2

สำหรับตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* จะเลือกเฉพาะตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มพร่องเอนไซม์ G 6-PD 1 คนซึ่งเป็นเพศหญิง มาทำ Direct sequencing

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ทั้ง 8 ชนิดด้วยวิธี PCR-RFLP ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 47 ตัวอย่าง

สถานะ (N)	เพศ	<i>G6PD Mahidol</i> (N)	<i>G6PD Canton</i> (N)	Unknown (N)
G 6-PD deficiency (20)	ชาย (15)	hemizygote (14)	hemizygote (1)	0
	หญิง (5)	heterozygote (3)	heterozygote (1)	1
Intermediate (27)	ชาย (8)	hemizygote (1)	-	7
	หญิง (19)	Heterozygote (14)	heterozygote (2)	3

สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ในกลุ่ม unrelated individual ทั้งหมด 80 คน เป็นเพศชาย 36 คน และหญิง 44 คน พบการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol*^{487A} จำนวน 20 คน คิดเป็นร้อยละ 25 โดยเป็น hemizygote 10 คนจากชายทั้งหมด 36 คนคิดเป็นร้อยละ 27.78 homozygote 1 คนจากหญิง 44 คนคิดเป็นร้อยละ 2.27 และ heterozygote 9 คนจากหญิง 44 คนคิดเป็นร้อยละ 20.45 นอกจากนี้พบการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Canton*^{1,376T} แบบ heterozygote 1 คน จากหญิง 44 คนคิดเป็นร้อยละ 2.27 แสดงดังตารางที่ 4.3.

ตารางที่ 4.3 การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบในกลุ่ม Unrelated individual

สถานะ (N)	เพศ (N)	G6PD Mahidol (N)	G6PD Canton (N)
G 6-PD deficiency (10)	ชาย (9)	hemizygote (9)	-
	หญิง (1)	heterozygote (1)	-
Intermediate (9)	ชาย (3)	hemizygote (1)	-
	หญิง (6)	heterozygote (4)	heterozygote (1)
Normal (61)	ชาย (24)	-	-
	หญิง (37)	heterozygote (4)	-
		homozygote (1)	-

เมื่อพิจารณาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในประชากรเพศชายทั้งหมดจำนวน 106 คน พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} จำนวน 15 คนคิดเป็นร้อยละ 14.15 และพบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} จำนวน 1 คนคิดเป็นร้อยละ 0.94 แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบในประชากรเพศชาย 106 คน

สถานะ (N)	G6PD Mahidol (N)	G6PD Canton (N)	Unknown (N)
G 6-PD deficiency (15)	hemizygote (14)	hemizygote (1)	-
Intermediate (8)	hemizygote (1)	-	(7)

ตารางที่ 4.5 แสดง Genotype frequency และ Allele frequency ทั้งในเพศหญิงและเพศชายในกลุ่มตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} และ G6PD Canton^{1,376T}

ตัวอย่าง	G6PD mutations	เพศหญิง						เพศชาย	
		Genotype frequency			Allele frequency		HWE P-value	Allele frequency	
		AA	Aa	aa	A	a		A	a
ประชากรทั้งหมด	Mahidol	0.75	0.24	0.01	0.87	0.13	0.72	0.86	0.14
	Canton	0.98	0.02	0.00	0.99	0.01	0.77	0.99	0.01
Unrelated individual	Mahidol	0.78	0.20	0.02	0.88	0.12	0.99	0.72	0.28
	Canton	0.98	0.02	0.00	0.99	0.01	0.99	1.00	0.00

D แทน G 6-PD deficiency

I แทน Intermediate

A แทน Dominant allele

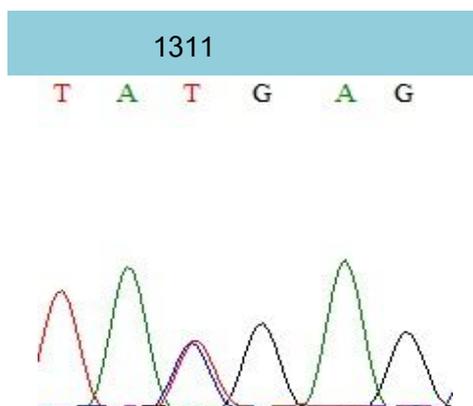
a แทน Recessive allele

ในการตรวจสอบความถูกต้องของผลจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ที่พบในประชากรทั้งหมดและกลุ่ม unrelated individual โดยใช้ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (p -value < 0.01) ผลการทดสอบพบว่า genotype frequency ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} ในประชากรทั้งหมดและกลุ่ม unrelated individual มีค่า p -value เท่ากับ 0.72 และ 0.99 ตามลำดับ และ genotype frequency ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton^{1,376T} ในประชากรทั้งหมดและกลุ่ม unrelated individual มีค่า p -value เท่ากับ 0.77 และ 0.99 ตามลำดับ แสดงว่าผลจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ที่พบไม่มีความแตกต่างกับกฎของ Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg

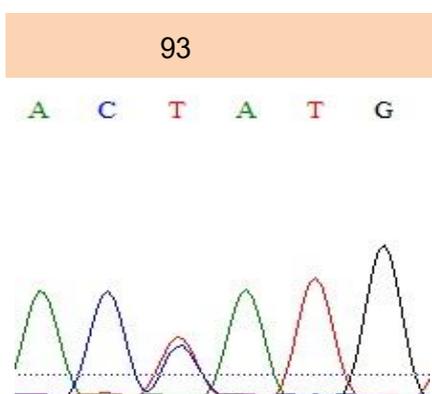
4.3.2 การกลายพันธุ์ของยีน G6PD จากการศึกษาดำรงวิธี Direct sequencing

จากการตรวจการกลายพันธุ์ในตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ทั้ง 8 ชนิด จำนวน 1 คน ซึ่งเป็นเพศหญิงด้วยวิธี Direct sequencing ใน exon ที่ 2-13 (coding sequence) ผลพบว่า ไม่พบการกลายพันธุ์ใดๆ บน coding sequence อีกทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในบริเวณ splicing donor (GT) และ splicing acceptor (AG) ของทุก exon ซึ่งการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนที่ผิดปกติได้ แต่ทั้งนี้จากผลการ

Sequencing พบเพียง SNP ตำแหน่ง nt1,311 C→T ใน exon 11 โดยเป็น heterozygote ดังภาพที่ 4.12 ซึ่ง SNPs ดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน อีกทั้งพบ SNP ในตำแหน่ง nt93 T→C ใน IVS11 โดยเป็น heterozygote ดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.12 แสดงChromatogramของSNP nt1,311C→T ใน exon 11 พบเป็นลักษณะ heterozygote ที่ซ้อนทับกันระหว่างกราฟ C (สีน้ำเงิน) และT (สีแดง)



ภาพที่ 4.13 แสดงChromatogramของSNP nt93T→C ใน IVS 11พบเป็นลักษณะ heterozygote ที่ซ้อนทับกันระหว่างกราฟ C (สีน้ำเงิน) และ T (สีแดง)

4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD*

จากการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน *G6PD* ทั้ง 2 ชนิด คือ SNPs nt1,311C→T และ nt93T→C ในทุกอัลลีลของตัวอย่างทั้งหมด ทั้งชนิดอัลลีลปกติ (*G6PD* B) และอัลลีลที่พบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bcl*I และ *Nla*III ตามลำดับ จากนั้น

ตรวจสอบด้วย 12% polyacrylamide gel electrophoresis ผลการตรวจสอบ nt1,311C→T และ nt93T→C แสดงดังภาพที่ 4.14-4.15 และตารางที่ 4.6

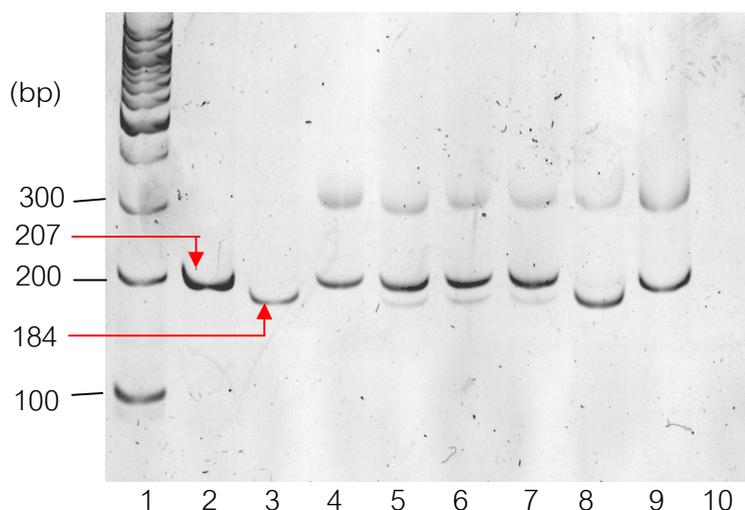
ตารางที่ 4.6 แสดง Genotype frequency และ Allele frequency ของ SNPs nt1,311C→T และ nt 93T→C ทั้งเพศหญิงและชายในชาวกะเหรี่ยงปากะญอ

ตัวอย่าง	SNPs	เพศหญิง						เพศชาย	
		Genotype frequency			Allele frequency		HWE <i>P</i> -value	Allele frequency	
		AA	Aa	aa	A	a		A	a
ประชากรทั้งหมด	1,311C→T	0.80	0.18	0.02	0.89	0.11	0.42	0.79	0.21
	93T→C	0.62	0.36	0.02	0.80	0.20	0.51	0.79	0.21
Unrelated individual	1,311C→T	0.75	0.20	0.05	0.85	0.15	0.39	0.89	0.11
	93T→C	0.61	0.34	0.05	0.78	0.22	0.99	0.89	0.11

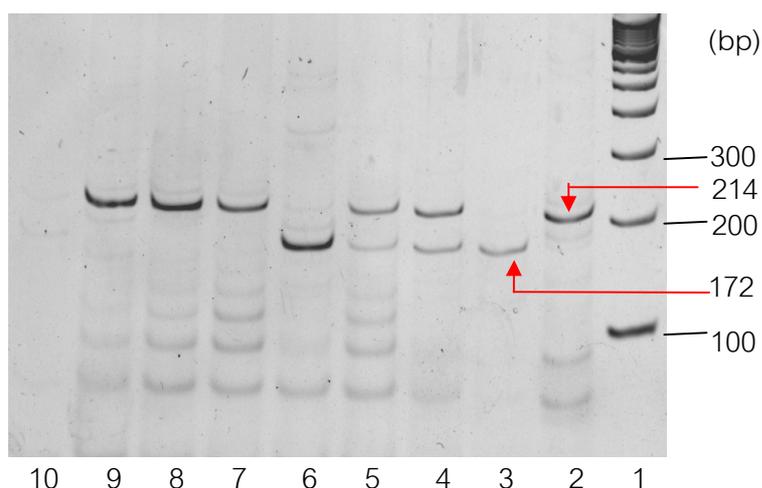
A แทน Dominant allele

a แทน Recessive allele

ในการตรวจสอบความถูกต้องของผลจีโนไทป์ของ nt1,311C→T และ nt93T→C ที่พบในประชากรทั้งหมดและกลุ่ม Unrelated individual โดยใช้ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (p -value<0.01) ผลการทดสอบพบว่า genotype frequency ของ nt1,311C→T ในประชากรทั้งหมดและกลุ่ม unrelated individual มีค่า p -value เท่ากับ 0.42 และ 0.39 ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบ genotype frequency ของ nt93T→C ในประชากรทั้งหมดและกลุ่ม unrelated individual พบมีค่า p -value เท่ากับ 0.51 และ 0.99 ตามลำดับ แสดงว่าผลจีโนไทป์ของ nt1,311C→T และ nt93T→C ไม่มีความแตกต่างกับกฎของ Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg นั้นเอง



ภาพที่ 4.14 ผลการตรวจสอบ SNP nt1,311C→T ของยีน *G6PD* ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BclI* ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ *BclI* มีขนาด 207 bp Lane 3 คือ DNA ที่มี SNP nt1,311 C→T เมื่อถูกตัดด้วย *BclI* มีขนาด 184 และ 23 bp (positive control) Lane 4 และ 9 คือ DNA ที่ไม่ถูกตัดด้วย *BclI* มีขนาด 207 bp (normal) Lane 5-7 คือ ตัวอย่างที่พบ SNP nt1,311C→T แบบ heterozygote เพราะเมื่อถูก *BclI* ตัดแล้วมีทั้งขนาด 207 184 และ 23 bp Lane 8 คือ ตัวอย่างที่พบ SNP nt1,311C→T แบบ hemizygote เพราะเมื่อถูกตัดด้วย *BclI* มีขนาด 184 และ 23 bp และ Lane 10 คือ H₂O (negative control ของ SNP nt1,311C→T)



ภาพที่ 4.15 ผลการตรวจสอบ SNP nt93T→C ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NlaIII* ใน Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 คือ DNA ที่ไม่ถูกตัดด้วย *NlaIII* มีขนาด 214 bp Lane 3 คือ DNA ที่มี SNP nt93T→C เมื่อถูกตัดด้วย *NlaIII* มีขนาด 172 และ 42 bp (positive

control) Lane 4-5 คือ DNA ที่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *N/AIII* พบ SNP nt93T→C แบบ heterozygote เพราะมีทั้งขนาด 214 172 และ 42 bp Lane 6 คือ DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *N/AIII* แล้วพบว่า เป็น homozygote SNP nt93T→C มีขนาด 172 และ 42 bp Lane 7-9 คือ DNA ที่ไม่ถูกตัดด้วย *N/AIII* มีขนาด 214 bp และ Lane 10 คือ H₂O (negative control ของ SNP nt93T→C)

จากผลการศึกษาดีนไทป์ nt1,311C→T และ nt93T→C ทั้งอัลลีลปกติ (G6PD B) และอัลลีลที่พบการกลายพันธุ์ สามารถนำมาสรุปเป็นรูปแบบ haplotype ได้ดังนี้ G6PD B มีรูปแบบ haplotype ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T ซึ่งพบมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 75.33 (226 ใน 300 อัลลีล) haplotype ชนิดที่ 2 : 1,311T, 93C คิดเป็นร้อยละ 16 (48 ใน 300 อัลลีล) haplotype ชนิดที่ 3 : 1,311C, 93C พบร้อยละ 8 (24 ใน 300 อัลลีล) และ haplotype ชนิดที่ 4 : 1,311T, 93T พบน้อยที่สุดร้อยละ 0.67 (2 ใน 300 อัลลีล) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ในขณะที่อัลลีล G6PD Mahidol^{487A} ทั้งหมด 49 อัลลีล พบรูปแบบ haplotype เพียงชนิดเดียวคือ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T ดังตารางที่ 4.5 สำหรับ G6PD Canton^{1,376T} 4 อัลลีลพบ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T เพียงชนิดเดียว และตัวอย่างอีก 1 คน ที่ไม่พบการกลายพันธุ์มี haplotype ชนิดที่ 4 : 1,311T, 93T

ตารางที่ 4.7 Haplotype ของอัลลีลต่างๆ บนยีน *G6PD* ในกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

Haplotype nt1,311, nt93	<i>G6PD</i> mutations (N (%))			Total
	G6PD B	Mahidol	Canton	
C, T	226 (75.33)	49 (100)	4 (100)	279 (79.04)
C, C	24 (8)	0	0	24 (6.80)
T, T	2 (0.67)	0	0	2 (0.56)
T, C	48 (16)	0	0	48 (13.60)
Total	300	49	4	353*

หมายเหตุ ตัวอย่าง 1 คนซึ่งเป็นเพศชาย ไม่สามารถระบุ nt93T→C ได้จึงเหลือตัวอย่างเพศชายที่นำมาคำนวณ allele frequency เพียง 105 คน จากทั้งหมด 106 คน

* อัลลีลทั้งหมดในประชากรที่ศึกษา โดยแบ่งเป็นชาย 105 คน หรือ 105 อัลลีล และหญิง 124 คน คิดเป็น 248 อัลลีล

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ซึ่งมีการถ่ายทอดความผิดปกติผ่านทางโครโมโซมเพศ x โดยการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* มีรูปแบบที่หลากหลายและมีความจำเพาะกับชาติพันธุ์ ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD สามารถพบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในบริเวณที่เคยมีรายงานการระบาดของมาลาเรีย รวมถึงในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีความหลากหลายทางด้านชาติพันธุ์ อาทิเช่น ไทย พม่า ลาว มอญ และกะเหรี่ยง เป็นต้น ชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ เป็นชาติพันธุ์หนึ่งที่ยังไม่พบรายงานความเชื่อมโยงทางด้านพันธุศาสตร์กับชาติพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชาติพันธุ์กะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอและชาติพันธุ์อื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

5.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

จากผลการศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยวิธี Fluorescence spot test ในกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอที่อาศัยอยู่ที่บ้านแม่सान ตำบลแม่สำ อำเภอสรีสาชนาถ จังหวัดสุโขทัย ทั้งหมด 86 ครอบครัว จำนวน 230 คน แบ่งเป็นเพศชาย 106 คนและเพศหญิง 124 คน พบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเพศชายร้อยละ 14.15 และในเพศหญิงร้อยละ 4.03 อีกทั้งพบผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ระดับปานกลาง ในเพศชายร้อยละ 7.55 และในเพศหญิงร้อยละ 15.32 เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดทั้งหมด 80 คน โดยเป็นเพศชาย 36 คน และเพศหญิง 44 คน พบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเพศชายร้อยละ 25 และในเพศหญิงร้อยละ 2.27 นอกจากนี้พบผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ระดับปานกลางในเพศชายร้อยละ 8.33 และในเพศหญิงร้อยละ 13.64 เมื่อวิเคราะห์ผลการตรวจสอบทั้งในตัวอย่างทั้งหมดและเฉพาะกลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง เนื่องจากเพศชายเมื่อได้รับการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* จะมีลักษณะ genotype เป็น hemizygote ทำให้การแสดงออกของการกลายพันธุ์เกิดขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่เพศหญิงที่มี genotype เป็นแบบ heterozygote จะมีกระบวนการ X-chromosome inactivation

แบบสุ่ม ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนให้แสดงออกเพียงยีนจากแท่งใดแท่งหนึ่งของโครโมโซมเพศ X จำนวนสองแท่ง ดังนั้นความรุนแรงและอาการทางคลินิกจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเม็ดเลือดแดง 2 ชนิดที่ได้รับผลกระทบจากระบวนการ X-chromosome inactivation ที่ต่างกัน กล่าวคือ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ปกติเป็นผลมาจากกระบวนการ X-chromosome inactivation ของแท่งโครโมโซมที่มีการกลายพันธุ์และกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ลดลงเนื่องจากเกิดกระบวนการ X-chromosome inactivation ในแท่งโครโมโซมที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* จึงเป็นเหตุให้ผู้หญิงที่มี genotype แบบ heterozygote มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่หลากหลายและสามารถจัดอยู่ในกลุ่มปกติ กลุ่มพร่องปานกลาง หรือกลุ่มพร่องเอนไซม์ G 6-PD มากได้ นอกจากนี้จะพบว่าผลการอธิบายดังกล่าวข้างต้นยังสอดคล้องกับความชุกของผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ระดับปานกลางซึ่งจะพบมากในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย

ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ ที่พบร้อยละ 14.15 นั้นมีค่าสูงใกล้เคียงหรือมากกว่าเมื่อเทียบกับชาติพันธุ์อื่นๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อาทิเช่น ในชาวไทยพบร้อยละ 11.1 (5) ชาวพม่าพบร้อยละ 7.3-11.0 (4, 6, 8) ชาวมาเลย์พบร้อยละ 4.6 (63) ชาวมอญพบร้อยละ 6.7-12.0 (4, 6) ชาวเขมรพบร้อยละ 12.6-26.1 (7, 64) และ ชาวลาวพบร้อยละ 7.2 (6) ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับชาติพันธุ์ที่เป็นชาวพื้นเมืองหรือชนกลุ่มน้อยที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคเดียวกันนี้ เช่นในชาวนานพบร้อยละ 10.8 (6) ชาวดานูพบร้อยละ 7.1 (6) ชาวคะฉิ่นพบร้อยละ 6.3 (6) ชาวอะบอริจินพบร้อยละ 6.0 (6) ชาวเกาะภูเก็ตพบร้อยละ 9.8 (65) และชาวลิซูปพบร้อยละ 2.6 (6) พบว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอนั้นพบได้มากกว่าชนพื้นเมืองดังที่กล่าวไป แต่เมื่อเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงไม่ทราบกลุ่มในจังหวัดราชบุรีซึ่งพบร้อยละ 13 (67) พบว่าชาวกะเหรี่ยงทั้งสองกลุ่มมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD สูงใกล้เคียงกัน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า นอกจากความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชาติพันธุ์แล้วภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ยังสามารถพบได้มากในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อันเป็นผลมาจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ที่ยอมให้ความผิดปกติของเอนไซม์ชนิดนี้คงอยู่ต่อไปในประชากร เพื่อจะป้องกันและลดความรุนแรงของโรคมาลาเรีย เนื่องจากผู้ป่วยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะมีการสร้าง NADPH ในเซลล์เม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติส่งผลให้สมดุขของออกซิเดชันและรีดักชันของเซลล์เสียไป ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกง่ายและมีผลต่อวงจรชีวิต (life cycle) ของเชื้อมาลาเรีย

5.2 การกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ก่อให้เกิดความแปรผันของเอนไซม์ G 6-PD รูปแบบต่างๆ ซึ่งมีความจำเพาะต่อชาติพันธุ์ ดังเช่นในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ซึ่งมีความหลากหลายทางเชื้อชาติ ศาสนา ภาษาและวัฒนธรรม จะสามารถพบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้หลากหลายเช่นกัน

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยงปากะญอพบการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol*^{487A} มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 68.09 ของกลุ่มผู้พ่องเอนไซม์ G 6-PD และของกลุ่มที่พ่องในระดับปานกลาง โดยเมื่อพิจารณาจะพบว่า ในกลุ่มพ่องเอนไซม์ตรวจพบ genotype มีลักษณะ hemizygote และ heterozygote ขณะที่กลุ่มพ่องเอนไซม์ปานกลางตรวจพบ genotype ลักษณะ hemizygote และ heterozygote เช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถพบ *G6PD Mahidol*^{487A} ในกลุ่มผู้ที่เอนไซม์ G 6-PD สามารถทำงานได้เป็นปกติอีกด้วย โดยพบลักษณะ homozygote 1 คนและ heterozygote 13 หรือพบได้ร้อยละ 14 ของคนปกติเพศหญิง ผลการทดลองที่เกิดขึ้นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสภาวะ reticulocytosis ที่มีเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocytes) ซึ่งมีระดับ G 6-PD ที่สูงกว่าเม็ดเลือดแดงเต็มวัย ทำให้ผลการทดสอบเป็นปกติหรือ false negative หรือสภาวะ leukocytosis และ thrombocytosis ที่มีเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดสูงส่งผลให้มีระดับ G 6-PD มากและอาจรบกวนการทดสอบ ทำให้ผลที่ได้มากเกินกว่าระดับความเป็นจริงซึ่งในความเป็นจริงแล้ว ผู้ป่วยอาจมีภาวะพ่องเอนไซม์ G 6-PD ก็เป็นไปได้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากกระบวนการ X-chromosome inactivation ดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นที่เป็นสาเหตุของระดับความรุนแรงและอาการทางคลินิกที่หลากหลาย อีกทั้งอาจเป็นผลมาจากชนิดของการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่างความแปรผันของเอนไซม์ โดยการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol*^{487A} (MIM : 305900.0005) เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสจาก G เป็น A ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 487 บริเวณ exon ที่ 6 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 163 เปลี่ยนจาก Glycine เป็น Serine ส่งผลให้เกิดความแปรผันของเอนไซม์และอาการทางคลินิกของการกลายพันธุ์ชนิดนี้อยู่ในประเภทที่ 3 หรือมีค่าร้อยละ 10-60 ของเอนไซม์ปกติ ผลการทดลองดังกล่าวยังชี้ให้เห็นว่าการตรวจสอบภาวะพ่องเอนไซม์ด้วยวิธีทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัยในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะแฝง จึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบทางอณูพันธุศาสตร์ของยีน *G6PD* ควบคู่ไปด้วยจึง

จะได้ผลที่ถูกต้องที่สุดโดยจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยและครอบครัวในการดูแลตนเองและระมัดระวังการใช้ยาและสารเคมีต่างๆที่อาจส่งผลให้เกิดอาการทางคลินิกต่างๆตามมาได้

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Caton^{1,376T} ประมาณร้อยละ 8.5 ของกลุ่มพี่น้องเอนไซม์และพี่น้องปานกลางโดยพบในผู้พี่น้องเอนไซม์ G 6-PD 2 คนเป็นลักษณะ hemizygote และ heterozygote และกลุ่มพี่น้องปานกลาง 2 คน ซึ่งพบเป็นลักษณะ heterozygote ทั้งสองคน ทั้งนี้การที่พบผู้พี่น้องเอนไซม์ที่มีลักษณะ heterozygote อาจเป็นผลมาจากปรากฏการณ์ skewing ของกระบวนการ X-chromosome inactivation ซึ่งเป็นการแสดงออกของโครโมโซมเพศ X ที่ active จากพ่อมากกว่าแม่ หรือจากแม่มากกว่าพ่อ ปรากฏการณ์ดังกล่าวส่งผลให้อัลลีลปกติถูกยับยั้งมากกว่าอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ หรืออาจเป็นผลมาจากชนิดของการกลายพันธุ์เอง ทั้งนี้การกลายพันธุ์ชนิด G6PD Caton^{1,376T} (MIM : 305900.0021) มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก G เป็น T ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1,376 ในบริเวณ exon ที่ 12 เป็นผลให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 459 เปลี่ยนจาก Arginine เป็น Leucine ส่งผลให้เกิดความแปรผันของเอนไซม์และอาการทางคลินิก เช่น ภาวะ hyperbilirubinemia (93) ซึ่งสามารถจัดอยู่ในประเภทที่ 3 หรือมีค่าร้อยละ 10-60 ของเอนไซม์ปกติ

สำหรับผู้พี่น้องเอนไซม์ G 6-PD อีก 1 คนที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์จากการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP และได้ดำเนินการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Direct sequencing พบว่าในตัวอยางนี้มีทั้ง SNP ที่ตำแหน่ง nt1,311C→T และ nt93T→C ซึ่ง SNPs ทั้ง 2 ตำแหน่งมักพบในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และชาวจีน นอกจากนี้ SNPs ดังกล่าวมีผลทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ลดลงและอาจเกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิก (94) โดย SNPs nt1,311C→T พบได้บ่อยทั้งคนปกติและในผู้ที่พี่น้องเอนไซม์ G 6-PD เช่น G6PD Mediterranean (4) นอกจากนี้ไม่พบการกลายพันธุ์ใดๆทั้งในบริเวณ coding region, splicing donor และ splicing acceptor อาจเนื่องมาจาก SNPs ที่เกิดขึ้นมีผลต่อเสถียรภาพของ mRNA หรือมีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA จึงมีผลทำให้การแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ G 6-PD แตกต่างกัน

จากการศึกษาอนุพันธุศาสตร์ของยีน *G6PD* ในอัลลีลทั้งหมดของชาวกะเหรี่ยงปากะญอพบ allele frequency ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} เท่ากับ 0.14 ซึ่งพบได้มากกว่าอัลลีลของการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ โดยที่ผลที่ได้เป็นเช่นเดียวกับการศึกษาการกลายพันธุ์ในชาวพม่า มอญ และกะเหรี่ยงไม่ทราบกลุ่มในจังหวัดราชบุรีที่พบ allele frequency ของ G6PD Mahidol^{487A} มากเป็นอันดับหนึ่งโดยมีค่าเท่ากับ 0.07, 0.08 และ 0.24 ตามลำดับ (4, 6, 67) นอกจากนี้ G6PD Mahidol^{487A} สามารถพบได้บ้างในกลุ่มผู้พี่น้องเอนไซม์ G 6-PD ชาวไทย โดย

พบร้อยละ 8 (5) และชาวมาเลย์ร้อยละ 15 (63) แต่ตรวจไม่พบในชาวเขมรและลาว เพราะชาวเขมรและลาวที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD มักพบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan⁸⁷¹ โดยพบร้อยละ 82-98 (7, 64) และ 46-100 (4, 6, 8, 95) ตามลำดับ จากการที่ G6PD Mahidol^{487A} และ G6PD Viangchan^{871A} พบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และมีความเฉพาะเจาะจงกับชาติพันธุ์และภูมิประเทศ จึงมีการแบ่งกลุ่มบรรพบุรุษของประชากรออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มชาวพม่าและมอญที่อยู่ทางตะวันตกของคาบสมุทรอินโดจีน ซึ่งมักพบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} (6-7) แต่ชาวไทยที่อยู่บริเวณศูนย์กลางของคาบสมุทรอินโดจีนสามารถพบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้ทั้งชนิด G6PD Mahidol^{487A} และ G6PD Viangchan^{871A} (heterogeneity) (5) จากข้อมูลที่กำลังกล่าวมาจึงเป็นไปได้ว่าชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอน่าจะมีที่มาร่วมกับชาวพม่า มอญ และกะเหรี่ยงในจังหวัดราชบุรี ผู้วิจัยจึงศึกษาภาวะพหุสัณฐาน nt1,311C→T และ nt93T→C ในยีน *G6PD* โดยนำข้อมูลมาสร้าง haplotype เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของชาวกะเหรี่ยงปากะญอ กับกลุ่มชาวพม่า ชาวมอญ และชาติพันธุ์อื่นๆ

จากการศึกษาภาวะพหุสัณฐาน nt1,311C→T และ nt93T→C ในทุกอัลลีลของชาวกะเหรี่ยงปากะญอ ทั้งอัลลีลที่พบการกลายพันธุ์และอัลลีลปกติ (G6PD B) ในทางทฤษฎีพบว่าความน่าจะเป็นของ haplotype ที่เกิดขึ้นจากภาวะพหุสัณฐาน 2 ตำแหน่ง ของ nt1,311C→T และ nt93T→C จะสามารถสร้าง haplotype ได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ คือ ชนิดที่ 1: 1,311C, 93T ชนิดที่ 2: 1,311T, 93C ชนิดที่ 3: 1,311C, 93C และชนิดที่ 4: 1,311T, 93T โดยผลการทดลองพบว่าอัลลีล G6PD Mahidol^{487A} ทั้งหมดในชาวกะเหรี่ยงปากะญอมีรูปแบบ haplotype ชนิดที่ 1: 1,311C, 93T เท่านั้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในชาวพม่า มอญและกะเหรี่ยงในจังหวัดราชบุรีที่อัลลีล G6PD Mahidol^{487A} มีรูปแบบ haplotype ชนิดที่ 1: 1,311C, 93T เพียงแบบเดียวเช่นกัน (4, 67) ขณะที่พบอัลลีลปกติ G6PD B ของชาวกะเหรี่ยงปากะญอตรวจพบ haplotype ทั้ง 4 แบบ โดยพบ haplotype ชนิดที่ 1: 1,311C, 93T พบร้อยละ 75.33 (226 ใน 300 อัลลีล) ซึ่งมากที่สุดเช่นเดียวกับ อัลลีล G6PD B ในชาวพม่าและมอญที่พบ haplotype ชนิดที่ 1 มากที่สุด หรือร้อยละ 71 และ 72 ตามลำดับ (4) และพบ haplotype ชนิดที่ 2: 1,311T, 93C ร้อยละ 16.00 (48 ใน 300 อัลลีล) ส่วน haplotype ชนิดที่ 3: 1,311C, 93C พบร้อยละ 8.00 (24 ใน 300 อัลลีล) และ haplotype ชนิดที่ 4: 1,311T, 93T พบน้อยที่สุดหรือร้อยละ 0.67 (2 ใน 300 อัลลีล) จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอน่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกับชาวพม่า มอญและชาวกะเหรี่ยงในจังหวัดราชบุรี เนื่องจากพบอัลลีล G6PD Mahidol^{487A} ใน

ความถี่ที่สูงเช่นเดียวกับชาวพม่าและมอญ อีกทั้งมีรูปแบบ haplotype ที่เหมือนกัน โดยคาดว่า การกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} น่าจะเกิดขึ้นจากอัลลีลปกติ G6PD B haplotype ชนิดที่ 1: 1,311C, 93T

เมื่อสืบค้นข้อมูลทางภาษาศาสตร์และมานุษยศาสตร์พบว่า ชาวกะเหรี่ยงเป็นชนกลุ่มน้อยที่ใช้ภาษาตระกูลเดียวกับชาวพม่า คือ ตระกูลจีน-ทิเบต (Sino-Tibetan language family) สาขาทิเบต-พม่า (Tibeto-Burman language) เป็นภาษาหลัก (4, 11) ในขณะที่ชาวมอญใช้ภาษาซึ่งจัดอยู่ในตระกูลออสโตรเอเชียติก (Austro-Asiatic) สาขามอญ-เขมร (Mon-Khmer language) เป็นภาษาหลัก (4) และข้อมูลทางประวัติศาสตร์พบว่า เมื่อประมาณ 2,000 ปีก่อนชาวมอญและชาวกะเหรี่ยงเป็นชนกลุ่มน้อยสองกลุ่มแรกที่อพยพและตั้งถิ่นฐานในประเทศพม่า หลังจากนั้นอีก 1,000 ปีต่อมา ชาวพม่าได้อพยพและตั้งถิ่นฐานในบริเวณดังกล่าว และกลายเป็นชนกลุ่มใหญ่ที่อาศัยอยู่ในประเทศพม่าจนถึงปัจจุบัน (9) แต่เมื่อมีการศึกษาเชิงพันธุศาสตร์ของภาวะ positive selection ของอัลลีล G6PD Mahidol^{487A} ในชาวกะเหรี่ยงจังหวัดราชบุรี (67) พบว่าชาวกะเหรี่ยงน่าจะอพยพมาจากทิเบตเนื่องจากมีลักษณะโครงหน้าคล้ายคลึงกับคนจีนและทิเบต (95) จึงมีการตั้งข้อสันนิษฐานว่า ชาวกะเหรี่ยงน่าจะมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ทิเบตหรือประเทศจีน (11) และมาตั้งถิ่นฐานอยู่ที่ประเทศพม่า เมื่อ 1,500 ปี ซึ่งเป็นช่วงที่มีมาลาเรียระบาดจึงได้เกิดการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} ขึ้นเพื่อความอยู่รอดของชาติพันธุ์ จากข้อมูลการสืบค้นทั้งหมดประกอบกับข้อมูลทางพันธุศาสตร์สามารถสรุปได้ว่า ชาวกะเหรี่ยง ชาวมอญ และชาวพม่าต่างก็อพยพเข้ามาอยู่ในประเทศพม่าเมื่อช่วงเวลา 1,000-2,000 ปีก่อน ซึ่งก่อนหน้านั้นไม่เป็นที่แน่ชัดว่าแต่ละกลุ่มชาติพันธุ์อพยพมาจากที่ใด แต่เมื่ออพยพมาอยู่บริเวณประเทศพม่าที่ซึ่งมีมาลาเรียระบาดตามมา จึงเกิดการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} ขึ้นจากอัลลีลปกติ G6PD B haplotype ชนิดที่ 1: 1,311C, 93T แล้วอัลลีลดังกล่าวมีการถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น เป็นเหตุให้พบความถี่ของอัลลีล G6PD Mahidol^{487A} สูงในทั้ง 3 กลุ่มชาติพันธุ์ จึงแสดงให้เห็นว่าชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ ชาวพม่า และชาวมอญต่างก็มีบรรพบุรุษร่วมกันมาตั้งแต่ประมาณ 1,500 ปีก่อน โดยอาจจะมีวัฒนธรรม ภาษา ศาสนา และประเพณีที่แตกต่างกันซึ่งอาจได้รับอิทธิพลมาจากช่วงก่อนอพยพย้ายถิ่นฐานเข้ามาอยู่ประเทศพม่า

แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ผู้วิจัยตรวจพบ G6PD Canton^{1,376T} ในชาวกะเหรี่ยงปากะญอ โดยมี allele frequency เท่ากับ 0.011 ของอัลลีลทั้งหมด ซึ่ง G6PD Canton^{1,376T} โดยมากมักพบในชาวจีนหรือร้อยละ 50-60 (5, 96) และสามารถพบได้ในชาวไทยโดยพบร้อยละ 2.3-10 ชาวพม่าพบ 12.5 และชาวลาวพบร้อยละ 3.8 (5) ทั้งนี้การที่พบ

G6PD Canton^{1,376T} ได้บ้างในประชากรกะเหรี่ยงปากะญอ น่าจะเป็นผลมาจากการเคลื่อนย้ายของยีน (Gene flow) จากการอพยพของชาวจีนมาสู่ชาวกะเหรี่ยงมากกว่าอิทธิพลของบรรพบุรุษหรือผู้บุกเบิก (founder effect) เพราะพบอัลลีลชนิด G6PD Canton^{1,376T} ได้น้อยมากในประชากร

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอที่อาศัยอยู่ที่บ้านแม่सान ตำบลแม่คำ อำเภอสรีสะเกษนาถ จังหวัดสุโขทัย 80 ครอบครัว จำนวน 230 คนมีความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ร้อยละ 14.15 ในเพศชาย และร้อยละ 4.03 ในเพศหญิง โดยพบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol^{487A} มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 68.09 รองลงมาคือ G6PD Canton^{1,376T} คิดเป็นร้อยละ 8.5 ของผู้พร่องเอนไซม์และพร่องปานกลาง อีกทั้งพบ haplotype ชนิดที่ 1 : 1,311C, 93T มากที่สุดทั้งในอัลลีลปกติ G6PD B และอัลลีลชนิด G6PD Mahidol^{487A} เช่นเดียวกับที่พบในชาวพม่าและมอญ ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอน่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกับชาวพม่าและมอญ โดยมี G6PD B haplotype 1,311C, 93T เป็นอัลลีลบรรพบุรุษของประชากรในกลุ่มนี้ สำหรับ G6PD Canton^{1,376T} ที่พบในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอพบได้ไม่มากนัก เนื่องจากอิทธิพลของ Gene flow จากชาวจีนมาสู่ชาวกะเหรี่ยง อีกทั้งการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ในชาวกะเหรี่ยงปากะญอมีลักษณะ homogeneity ซึ่งพบเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ G6PD Mahidol^{487A} และ G6PD Canton^{1,376T} สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจมาจากลักษณะภูมิลำเนาของชาวกะเหรี่ยงที่มีภูเขาล้อมรอบ อีกทั้งมีสังคมแบบปิด ที่ไม่ค่อยมีการติดต่อสัมพันธ์กับชาติพันธุ์อื่นๆ ทำให้ไม่พบความหลากหลายของการกลายพันธุ์ของยีน G6PD เหมือนกับชาติพันธุ์อื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

รายการอ้างอิง

- (1) Beutler E. G6PD deficiency. Blood 84 (11) (1994) : 3613-3636.
- (2) Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a historical perspective. Blood 111 (1) (2008) : 16-24.
- (3) Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. Clinical Microbiology Reviews 15 (4) (2002) : 564-594.
- (4) Nuchprayoon I, Louicharoen C, Charoenvej W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Mon and Burmese of southern Myanmar. Journal of human genetics 53 (1) (2008) : 48-54.
- (5) Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand : G6PD Viangchan (871G> A) is the most common deficiency variant in the Thai population. Human Mutation 19 (2) (2002) : 185-190.
- (6) Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Lin K, et al. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. Human genetics 108 (6) (2001) : 445-449.
- (7) Louicharoen C, Nuchprayoon I. G6PD Viangchan (871G> A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population. Journal of human genetics 50 (9) (2005) : 448-452.
- (8) Matsuoka H, Wang J, Hirai M, Arai M, Yoshida S, Kobayashi T, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Myanmar : G6PD Mahidol (487G> A) is the most common variant in the Myanmar population. Journal of human genetics 49 (10) (2004) : 544-547.
- (9) Moonieinda VA, Abbott. The Karen people : culture, faith and history. The Karen Buddhist Dhamma Dhutta Foundation, 2010.
- (10) Schliesinger J. Ethnic groups of Thailand : non-Tai-speaking peoples. White Lotus, 2000.
- (11) Besaggio D, Fuselli S, Srikumool M, Kampuansai J, Castri L, Tyler-Smith C, et al.

- Genetic variation in Northern Thailand Hill Tribes : origins and relationships with social structure and linguistic differences. BMC evolutionary biology 7 (Suppl 2) (2007) : S12.
- (12) Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Adv Hum Genet 14 (1985) : 217-229.
- (13) Notaro R, Afolayan A, Luzzatto L. Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. The FASEB Journal 14 (3) (2000) : 485-494.
- (14) Battistuzzi G, D'Urso M, Toniolo D, Persico G, Luzzatto L. Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 82 (5) (1985) : 1465-1469.
- (15) Franzč A, Ferrante MI, Fusco F, Santoro A, Sanzari E, Martini G, et al. Molecular anatomy of the human glucose 6-phosphate dehydrogenase core promoter. FEBS letters 437 (3) (1998) : 313-318.
- (16) Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The lancet 371 (9606) (2008) : 64-74.
- (17) Phompradit P, Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rueangweerayut R, Hongkaew Y, Yamnuan R, et al. Prevalence and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Thai and Burmese populations in malaria endemic areas of Thailand. Malaria journal 10 (1) (2011) : 368.
- (18) Nuchprayoon I. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency : Molecular and Clinical Aspects. Bangkok : Charansanitwong Printing, 2010.
- (19) Szabo P, Purrello M, Rocchi M, Archidiacono N, Alhadeff B, Filippi G, et al. Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. Proceedings of the National Academy of Sciences 81 (24) (1984) : 7855-7859.
- (20) National Center for Biotechnology Information (NCBI). GLUCOSE-6-PHOSPHATE

DEHYDROGENASE (G6PD) [database on the Internet]. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. [2012, March 12]

- (21) Peisach J, Blumberg W, Rachmilewitz E. The demonstration of ferrihemochrome intermediates in Heinz body formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure 393 (2) (1975) : 404-418.
- (22) Baehner RL, Nathan DG, Castle WB. Oxidant injury of caucasian glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient red blood cells by phagocytosing leukocytes during infection. Journal of Clinical Investigation 50 (12) (1971) : 2466-2473.
- (23) Luzzatto L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency : from genotype to phenotype. Haematologica 91(10) (2006) : 1303-1306.
- (24) Au SWN, Gover S, Lam V, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase : the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. Structure 8 (3) (2000) : 293-303.
- (25) Luzzatto L, Poggi V. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Hemolytic anemias (1995) : 1-25.
- (26) Cohen P, Rosemeyer M. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. European Journal of Biochemistry 8 (1) (1969) : 8-15.
- (27) Wrigley N, Flora AD. Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: Electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers. Journal of Molecular Biology 68 (3) (1972) : 483-488.
- (28) Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al. Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 4 Volume Set, McGraw-Hill Professional Publishing, 2000.
- (29) Persico MG, Viglietto G, Martini G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, et al. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones : primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. Nucleic

- acids research 14 (6) (1986) : 2511-2522.
- (30) Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay : How, when, and why? IUBMB life 61 (1) (2009) : 27-34.
- (31) Bhadbhade MM, Adams MJ, Flynn TG, Richard Levy H. Sequence identity between a lysine-containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase and an active site peptide from human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. FEBS letters 211 (2) (1987) : 243-246.
- (32) De Vita G, Alcalay M, Sampietro M, Cappelini M, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. American journal of human genetics 44 (2) (1989) : 233-240.
- (33) Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency : the genotype-phenotype association. Blood reviews 21 (5) (2007) : 267-283.
- (34) Alving A, Carson P, Flanagan C, Ickes C. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science (New York, NY) 124 (3220) (1956): 484-485.
- (35) Xu W, Westwood B, Bartsocas C, Malcorra-Azpiazu J, Indrak K, Beutler E. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. Blood 85 (1) (1995) : 257-263.
- (36) Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons J, Prchal J. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase A⁻. Blood 74 (7) (1989) : 2550-2555.
- (37) Group WW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Bulletin OMS 67 (6) (1989) : 601-611.
- (38) Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Biochemistry. 4 th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- (39) Tan K. Some aspects on management of neonatal jaundice in Singapore. The Nursing journal of Singapore 18 (1) (1978) : 122-141.
- (40) Tan K. Glucose-6-phosphate dehydrogenase status and neonatal jaundice. Archives of disease in childhood 56 (11) (1981) : 874-877.

- (41) Singh H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a preventable cause of mental retardation. British medical journal 292 (6517) (1986) : 397-398.
- (42) Meloni T, Cagnazzo G, Dore A, Cutillo S. Phenobarbital for prevention of hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient newborn infants. The Journal of pediatrics 82 (6) (1973) : 1048-1051.
- (43) Dehydrogenase WHOSGotSoPftSoG--P. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase : report of a WHO scientific group. World Health Organ Tech Rep Ser (1967) : 1-53.
- (44) Calabro V, Cascone A, Malaspina P, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in southern Italy : a case of G6PD A (-) associated with favism. Haematologica 74 (1) (1989) : 71-73.
- (45) Galiano S, Gaetani GF, Barabino A, Cottafava F, Zeitlin H, Town M, et al. Favism in the African type of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (A-). British Medical Journal 300 (6719) (1990) : 236-237.
- (46) Stamatoyannopoulos G, Fraser G, Motulsky A, Fessas P, Akrivakis A, Papayannopoulou T. On the familial predisposition to favism. American journal of human genetics 18 (3) (1966) : 253-263.
- (47) Homegrown. Fava Fava Fava. Root Simple [Online]. 2009. Available from : <http://www.rootsimple.com/2009/04/fava-fava-fava.html> [2012,February 10]
- (48) Smith SE. What are fava beans? wiseGEEK [Online]. 2012 Available from: <http://www.wisegeek.com/what-are-fava-beans.htm>. [2012,February11]
- (49) Brown E, Roberts F. Formation of vicine and convicine by *Vicia faba*. Phytochemistry 11 (11) (1972) : 3203-3206.
- (50) Beutler E. The hemolytic effect of primaquine and related compounds : a review. Blood 14 (2) (1959) : 103-139.
- (51) Beutler E, Dern R, Alving AS. The hemolytic effect of primaquine. III. A study of primaquine-sensitive erythrocytes. The Journal of laboratory and clinical medicine 44 (2) (1954) : 177-184.
- (52) Siddiqui T, Khan A. Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute

- hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Military medicine 163 (6) (1998) : 434-435.
- (53) Tugwell P. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Nigerians with jaundice associated with lobar pneumonia. The lancet 301 (7810) (1973) : 968-970.
- (54) Szeinberg A, Sheba C, Hirshorn N, Bodonyi E. Studies on erythrocytes in cases with past history of favism and drug-induced acute hemolytic anemia. Blood 12 (7) (1957) : 603-613.
- (55) Meloni T, Forteleoni G, Ena F, Meloni GF. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and bacterial infections in northern Sardinia. The Journal of pediatrics 118 (6) (1991) : 909-911.
- (56) Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson SB. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils : evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (9) (1994) : 3680-3684.
- (57) Gray G, Stamatoyannopoulos G, Naiman S, Kliman M, Klebanoff S, Austin T, et al. Neutrophil dysfunction, chronic granulomatous disease, and non-spherocytic haemolytic anaemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The lancet 302 (7828) (1973) : 530-534.
- (58) Beutler E. G6PD : population genetics and clinical manifestations. Blood reviews 10 (1) (1996) : 45-52.
- (59) Naylor C, Rowland P, Basak A, Gover S, Mason P, Bautista J, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. Blood 87 (7) (1996) : 2974-2982.
- (60) Iancovici-Kidon M, Sthoeger D, Abrahamov A, Volach B, Beutler E, Gelbart T, et al. A new exon 9 Glucose-6-phosphate Dehydrogenase mutation (G6PD "Rehovot") in a Jewish Ethiopian family with variable phenotypes. Blood Cells, Molecules, and Diseases 26 (6) (2000) : 567-571.

- (61) Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. American family physician 72 (7) (2005) : 1277-1282.
- (62) Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a systematic review and meta-analysis. Blood Cells, Molecules, and Diseases 42 (3) (2009) : 267-278.
- (63) Ainoon O, Yu Y, Amir Muhriz A, Boo N, Cheong S, Hamidah N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Malaysian Malays. Human Mutation 21 (1) (2003) : 101-109.
- (64) Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, Jalloh A, Sato H, Yoshida S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia : G6PD Viangchan (871G> A) is the most common variant in the Cambodian population. Journal of human genetics 50 (9) (2005) : 468-472.
- (65) Ninokata A, Kimura R, Samakkarn U, Settheetham-Ishida W, Ishida T. Coexistence of five G6PD variants indicates ethnic complexity of Phuket islanders, Southern Thailand. Journal of human genetics 51 (5) (2006) : 424-428.
- (66) Ganczakowski M, Town M, Bowden D, Vulliamy T, Kaneko A, Clegg J, et al. Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). American journal of human genetics 56 (1) (1995) : 294-301.
- (67) Louicharoen C, Patin E, Paul R, Nuchprayoon I, Witoonpanich B, Peerapittayamongkol C, et al. Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces Plasmodium vivax density in Southeast Asians. Science 326 (5959) (2009) : 1546-1549.
- (68) Haldane JBS. Suggestions as to quantitative measurement of rates of evolution. Evolution 3 (1) (1949) : 51-56.
- (69) Desforges JF, Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. New England Journal of Medicine 324 (3) (1991) : 169-74.
- (70) Gurbuz N, Aksu TA, Van Noorden CJF. Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase

- deficiency. Acta histochemica 107 (4) (2005) : 261-267.
- (71) FAIRBANKS VF, LAMPE LT. A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes : applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Blood 31 (5) (1968) : 589-603.
- (72) Chen EY, Zollo M, Mazzarella R, Ciccodicola A, Chen C, Zuo L, et al. Long-range sequence analysis in Xq28 : thirteen known and six candidate genes in 219.4 kb of high GC DNA between the RCP/GCP and G6PD loci. Human molecular genetics 5 (5) (1996) : 659-668.
- (73) Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. Journal of Molecular Medicine 76 (8) (1998) : 581-588.
- (74) Toniolo D, Filippi M, Dono R, Lettieri T, Martini G. The CpG island in the 5' region of the G6PD gene of man and mouse. Gene 102 (2) (1991) : 197-203.
- (75) Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L, Dono R, Viglietto G, et al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. The EMBO journal 5 (8) (1986) : 1849-1855.
- (76) Chen EY, Cheng A, Lee A, Kuang WJ, Hillier LD, Green P, et al. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. Genomics 10 (3) (1991) : 792-800.
- (77) Poggi V, Town M, Foulkes N, Luzzatto L. Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. Biochemical journal 271 (1) (1990) : 157-160.
- (78) Mason PJ, Stevens DJ, Luzzatto L, Brenner S, Aparicio S. Genomic structure and sequence of the Fugu rubripes glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (G6PD). Genomics 26 (3) (1995) : 587-591.
- (79) วันชัย วนะชีวนาวิน. G-6-PD deficiency. 1 ed. กรุงเทพฯ : สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย, 2536.
- (80) Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG. Neonatology : pathophysiology and

management of the newborn. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

- (81) Beutler E, Kuhl W, Sáenz GFR, Walter Rodríguez R. Mutation analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Costa Rica. Human genetics 87 (4) (1991) : 462-464.
- (82) Sáenz G, Chaves M, Berrantes A, Elizondo J, Montero A, Yoshida A. A glucose-6-phosphate dehydrogenase variant, Gd (-) Santamaria found in Costa Rica. Acta haematologica 72 (1) (1984) : 37-40.
- (83) MacDonald D, Town M, Mason P, Vulliamy T, Luzzatto L. Deficiency in red blood cells. Nature 350 (1991) : 115.
- (84) Hirono A, Fujii H, Shima M, Miwa S. G6PD Nara : A new class 1 glucose-6-phosphate dehydrogenase variant with an eight amino acid deletion. Blood 82 (11) (1993) : 3250-3252.
- (85) Sanders S, Smith DP, Thomas GA, Williams ED. A glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) splice site consensus sequence mutation associated with G6PD enzyme deficiency. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 374 (1) (1997) : 79-87.
- (86) Longo L, Vanegas OC, Patel M, Rosti V, Li H, Waka J, et al. Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. The EMBO journal 21 (16) (2002) : 4229-4239.
- (87) Manco L, Pereira J, Relvas L, Rebelo U, Crisóstomo AI, Bento C, et al. Chronic hemolytic anemia is associated with a new glucose-6-phosphate dehydrogenase in-frame deletion in an older woman. Blood Cells, Molecules, and Diseases 46 (4) (2011) : 288-293.
- (88) Vulliamy T, Othman A, Town M, Nathwani A, Falusi A, Mason P, et al. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A⁻. Proceedings of the National Academy of Sciences 88 (19) (1991) : 8568-8571.
- (89) มุลนิธิกระจกเงา. โครงการพิพิธภัณฑ์ชนเผ่าออนไลน์ (Virtual Hilltribe Museum) [Online]. Available from : <http://www.hilltribe.org/thai/karen/> [2012, March 10]

- (90) Louicharoen C. A role for G6PD Mahidol in Protection against malaria in Southeast Asia. Doctoral dissertation, Biomedical Sciences (Interdisciplinary Program), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 2008.
- (91) Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning : a laboratory manual. 3 ed. CSHL press, 2001.
- (92) Kim S, Nguon C, Guillard B, Duong S, Chy S, Sum S, et al. Performance of the CareStart™ G6PD Deficiency Screening Test, a Point-of-Care Diagnostic for Primaquine Therapy Screening. PloS one 6 (12) (2011) : e28357 1-9.
- (93) Huang CS, Hung KL, Huang MJ, Li YC, Liu TH, Tang TK. Neonatal jaundice and molecular mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient newborn infants. American journal of hematology 51 (1) (1996) : 19-25.
- (94) Moiz B, Nasir A, Moatter T, Naqvi Z, Khurshid M. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Pakistani population. International journal of laboratory hematology 33 (6) (2011) : 570-578.
- (95) Hsia YE, Miyakawa F, Baltazar J, Ching NSP, Yuen J, Westwood B, et al. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Chinese, Filipinos, and Laotians from Hawaii. Human genetics 92 (5) (1993) : 470-476.
- (96) Jiang W, Yu G, Liu P, Geng Q, Chen L, Lin Q, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population. Human genetics 119 (5) (2006) : 463-478.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 1/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ชื่อโครงการวิจัย ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

ผู้วิจัย

ชื่อ นางสาว อภากร กาญจนวิทยากุล

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 วังใหม่ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 084-5498981

ชื่อ อาจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 วังใหม่ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4482, 081-710-9611

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากท่านเป็นชาวไทยเชื้อสายกะเหรี่ยง ที่อาศัยอยู่ใน หมู่บ้านแม่สถาน ตำบลแม่ลำ อำเภอสรีษชนาลัย จังหวัดสุโขทัย ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 2/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

เหตุผลความเป็นมา

เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) มีหน้าที่สร้างสารป้องกันภาวะเครียดอันเกิดจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์ การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่ส่งผลให้เกิดดีซ่านในเด็กแรกเกิด และภาวะโลหิตจางเฉียบพลัน เมื่อร่างกายได้รับสารกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จากการศึกษาในประชากรภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD มีอยู่ประมาณร้อยละ 7-26 และมีรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ต่างกัน โดยขึ้นกับชาติพันธุ์ที่ได้รับอิทธิพลจากบรรพบุรุษ การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในภูมิภาคนี้มี 2 ชนิด คือ ชนิดเวียงจันทน์ พบได้มากในชาวไทย เขมร และลาว และชนิดมิดดิล ซึ่งพบมาก ในชาวพม่า มอญ ชาวกะเหรี่ยงเป็นชนกลุ่มใหญ่ในประเทศพม่าและเป็นชนกลุ่มน้อยที่อพยพมาอาศัยอยู่ในประเทศไทยกว่า 300,000 คน ชาวกะเหรี่ยงมีความแตกต่างจากชาวพม่า โดยมีเอกลักษณ์ทางด้านศิลปะและวัฒนธรรมที่โดดเด่นเป็นของตนเอง และเมื่อดูจากลักษณะทางกายภาพ พบว่าชาวกะเหรี่ยงมีลักษณะโครงหน้าคล้ายคลึงกับคนจีนและทิเบต จึงมีการตั้งข้อสันนิษฐานว่า ชาวกะเหรี่ยงน่าจะมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ทิเบตหรือประเทศจีน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาหรือหลักฐานใดที่จะอธิบายถึงพันธุศาสตร์ประชากรของชาติพันธุ์กะเหรี่ยง ด้วยเหตุผลทั้งหมดจึงเป็นที่มาของการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของชาวกะเหรี่ยง โดยผ่านการศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD การกลายพันธุ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชาติพันธุ์กะเหรี่ยงและชาติพันธุ์อื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ

1. เพื่อศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสในชาวกะเหรี่ยง
2. เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 220 คน

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant) หน้า 3/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอรับกวน

1. สอบถามข้อมูล ดังนี้ อายุ เชื้อชาติของท่านและของครอบครัวท่าน และลำดับความสัมพันธ์ในเครือญาติ ของท่านกับอาสาสมัครท่านอื่น
2. เจาะเลือดของท่านบริเวณต้นแขน โดยจะเจาะเลือดจำนวน 3 มิลลิลิตร 2 หลอด เพื่อตรวจภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน G6PD ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขอรับกวนเวลาของท่านในการเจาะเลือดครั้งนี้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น และผู้วิจัยจะแจ้งผลการตรวจให้ท่านทราบภายหลังอีกครั้ง ซึ่งตัวอย่างเลือดที่เหลือ ทางผู้วิจัยจะทำการทำลายทิ้งโดยจะฆ่าเชื้อในเบื้องต้นก่อนทำลาย
3. เก็บตัวอย่างสารพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากตัวอย่างเลือด เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนสร้างเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ในห้องปฏิบัติการที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และผู้วิจัยขอรับกวนเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของท่านจนกว่าจะเสร็จสิ้นการวิจัย

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านตอบแบบสอบถาม หรือตอบคำถามผู้วิจัยตามความสัตย์จริง รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ได้รับการเจาะเลือดให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรกดหรือแกะพลาสติกบริเวณที่บีบบริเวณที่เจาะเลือด หรือคลายการพันแขนก่อนเลือดหยุดไหล เพราะอาจทำให้เกิดรอยช้ำหรือแผลติดเชื้อได้

คำแนะนำสำหรับอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยก่อนเจาะเลือด

1. ก่อนที่ท่านจะเข้าร่วมโครงการและรับการเจาะเลือด ทางผู้วิจัยพร้อมกับเจ้าหน้าที่อาสาสมัครหมู่บ้าน (อสม.) หรือล่ามที่สามารถสื่อสารกับท่านได้ จะให้คำแนะนำต่างๆกับท่าน เกี่ยวกับภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทั้งสาเหตุของโรค อาการของโรค การปฏิบัติตัวของผู้ป่วย และการถ่ายทอดทางพันธุกรรม
2. ในขณะที่เจาะเลือด หากท่านเกิดอาการหน้ามืด วิงเวียน หรือใจสั่น ควรแจ้งให้เจ้าหน้าที่ทราบ เพื่อจะได้รับการปฐมพยาบาลเบื้องต้นทันที

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 4/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3. ในระหว่างการเจาะเลือดท่านไม่ควรเกร็ง ขยับหรือดึงแขนกลับในขณะที่เจาะเลือด เพราะอาจทำให้เข็มหลุดจากเส้นเลือดหรือแทงทะลุเส้นเลือดได้ นอกจากนี้อาจทำให้เกิดอาการบวมแดง หรือมีจ้ำสีเขียวตามมา

คำแนะนำของการเข้าร่วมโครงการวิจัยในช่วงหลังทราบผลการวิจัย

1. เจ้าหน้าที่จะแจ้งให้ท่านทราบผลการวิจัย พร้อมทั้งจะให้คำแนะนำต่างๆแก่ท่าน ในกรณีที่พบว่าท่านมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยจะแนะนำในเรื่องการปฏิบัติตัวเพื่อหลีกเลี่ยงอาการแสดงของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD
2. ท่านจะได้รับคำแนะนำด้านการวางแผนครอบครัวในการมีบุตร เพื่อป้องกันปัญหาโรคทางพันธุกรรมภายหลังทราบผลการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับในการเข้าร่วมวิจัย คือ

1. ท่านอาจจะเสียเวลาในการทำงาน หรืออาจประสบอุบัติเหตุได้ในระหว่างการเดินทางเข้าร่วมการวิจัย ณ สถานีอนามัย
2. ท่านอาจจะรู้สึกไม่สบายใจเมื่อผู้วิจัยสอบถามข้อมูลของท่าน
3. ท่านอาจรู้สึกกลัว เป็นกังวล หรือตื่นเต้นในระหว่างการเจาะเลือด

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ เพื่อความปลอดภัยของท่านควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อมีความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 5/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใดๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะได้รับประโยชน์จากการเข้าร่วม คือ ท่านจะได้รับทราบผลการตรวจการทำงานของเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสของท่าน หากผลการตรวจพบว่าท่านได้รับผลกระทบจากภาวะดังกล่าว ท่านจะได้รับคำแนะนำในการดูแลสุขภาพอย่างถูกวิธี เพื่อลดความเสี่ยงที่อาจจะส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคได้ อีกทั้งท่านจะได้รับคำแนะนำด้านการวางแผนครอบครัวในการมีบุตร เพื่อป้องกันปัญหาโรคทางพันธุกรรม ภายหลังจากทราบผลการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส แต่ทั้งนี้การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้มีผลทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้นหรือเพิ่มความรุนแรงของภาวะดังกล่าวแต่อย่างใด

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลประวัติเชื้อชาติ และเชื้อสายวงศ์ตระกูลของท่าน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษา

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant) หน้า 6/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใดๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ อาจารย์ ดร.ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆ ในการเข้าร่วมโครงการวิจัย (ค่าใช้จ่ายอื่นที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด)

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย แต่ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันทีจากอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้ทำวิจัยยินดีรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลงตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาสุขภาพของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่านหรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านตั้งครุภะระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 7/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่ท่านนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่านจะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้งหรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ อาจารย์ ดร.ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่นๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของโครงการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้
7. ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใดๆ ทั้งสิ้น
8. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 8/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

9. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพล บังคับ ช่มชู้ หรือการหลอกลวง
10. ท่านจะได้รับคำแนะนำด้านการวางแผนครอบครัวในการมีบุตร เพื่อป้องกันปัญหาโรคทางพันธุกรรม ภายหลังจากผลการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสของท่าน
11. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจที่จะอนุญาตให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของท่าน ที่เหลือจากการวิจัยหรือไม่ก็ได้ เพื่อการตรวจเพิ่มเติมในอนาคต หรือเพื่อการศึกษาใหม่ในอนาคต แต่ทั้งนี้การใช้ตัวอย่างนี้ของท่านจะได้รับการยืนยันเรื่องให้คณะกรรมการจริยธรรมพิจารณาอีกครั้ง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับ การปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ ชั้น 3 โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย</p> <p>หน้า 1/2</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่ บ้านเลขที่..... หมู่..... หมู่บ้าน..... ตำบล..... อำเภอ..... จังหวัด..... ได้
อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และ
ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วย
เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจาก
ผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้ง
ประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดย
ผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล
โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วม
โครงการวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจาก
ข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนอาจได้รับอนุญาตให้
เข้ามาตรวจสอบและประมวลผลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล
เท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของ
ผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติมหลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วม
โครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/ หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย หน้า 2/2</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้า และสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัย รวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคต หรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอม ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือ ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย (กรณีผู้ให้ความยินยอมไม่สามารถอ่านหนังสือได้)</p> <p>หน้า 1/2</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....
ที่อยู่ บ้านเลขที่.....หมู่.....หมู่บ้าน..... ตำบล.....อำเภอ.....จังหวัด.....
ได้ฟังรายละเอียดจากผู้วิจัยที่ได้อ่านเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....
และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อ ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติมหลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/ หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย (กรณีผู้ให้ความยินยอมไม่สามารถอ่านหนังสือได้)</p> <p>หน้า 2/2</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัย รวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคต หรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าลงนามหรือประทับลายนิ้วมือของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ ด้วยความเต็มใจ

.....
(ลายนิ้วมือผู้ยินยอม)

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอม ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือ ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วย ความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

แบบฟอร์มการสัมภาษณ์อาสาสมัคร (Interviewing form)	เลขที่(No).....
-----------------------------------------------------	-----------------

การวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์แบบไม่สมดุลระหว่างความหลากหลายทางพันธุศาสตร์ของยีน
ซีเอกซ์โออาร์เอฟทู (CXorf2) ในกลุ่มยีนควบคุมการมองเห็นสีแดง-เขียว
และการกลายพันธุ์ของยีนจีซีกส์พีดี (G6PD) บนโครโมโซมเอกซ์คิวทูเอท (Xq28)

เพศ ชาย หญิง อายุ.....ปี เชื้อชาติของอาสาสมัคร กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

สถานะภาพ โสด สมรส จำนวนบุตรชาย คน จำนวนบุตรสาว.....คน

เชื้อชาติบิดา กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

เชื้อชาติมารดา กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

เชื้อชาติปู่ กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

เชื้อชาติย่า กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

เชื้อชาติตา กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

เชื้อชาติยาย กะเหรี่ยง อื่นๆ.....

ผลการทดสอบภาวะตาบอดสี

<input type="checkbox"/> ตาบอดสีแดง	<input type="checkbox"/> ตาบอดสีเขียว	<input type="checkbox"/> ไม่พบความผิดปกติ
-------------------------------------	---------------------------------------	-------------------------------------------

เฉพาะเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
ค่าการทำงานของเอนไซม์G6PDI.U./g Hb	<input type="checkbox"/> ปกติ	<input type="checkbox"/> พร่อง
รูปแบบการกลายพันธุ์ยีนG6PD:.....		
Haplotype.....		
รูปแบบการกลายพันธุ์ยีนCXorf2:.....		
รูปแบบการกลายพันธุ์ยีนOPNLW1, OPNMW1:.....		

ภาคผนวก ข

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1. เครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณดีเอ็นเอ Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)
- 1.2. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนและควบคุมอุณหภูมิ UNIVERSAL 320R (Hettich zentrifugen)
- 1.3. อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติจากซีโรปิเปต accu-jet®pro (BRAND)
- 1.4. เครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้น Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (BIO-RAD)
- 1.5. เครื่องแยกขนาดสารพันธุกรรมพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแบบปรับค่าได้ แนวตั้ง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD)
- 1.6. เครื่องแยกสารพันธุกรรมแนวนอนขนาดเล็กแบบหน้ากว้างพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแบบปรับค่าได้ IMR-001 Intelligent Electrophoresis Unit i-MyRun.N (MY-RUN)
- 1.7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ YCW-010 (GEMMYCO)
- 1.8. เครื่องให้ความร้อนแบบแห้ง EL-02-220 (Major science)
- 1.9. ตู้เย็น (SUPER CHILL)
- 1.10. ตู้เย็นแช่แข็ง (SHARP)
- 1.11. เครื่องหมุนรอบแกนแบบตั้งโต๊ะ Bio RS-24 (BIOSAN)
- 1.12. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง UB-10 (Ultra BASIC)
- 1.13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- 1.14. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านได้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง SY-YOU2 (DENVER INSTRUMENT)
- 1.15. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง PIONEER (OHAUS)
- 1.16. Hemocue (Hemocue AB)
- 1.17. เตาให้ความร้อนและชุดกวนสารละลาย HS-115 (HL Instrument)
- 1.18. เครื่องให้ความร้อนควบคุมอุณหภูมิ Elite (Major Science)
- 1.19. ไมโครเวฟ R-250 Light up Dial® (SHARP)

- 1.20. เครื่องผสมสาร XHO (Vortex Mixer)
- 1.21. เครื่องปั่นตกสารละลาย SPROUT™ (HEATHROW SCIENTIFIC® LLC)
- 1.22. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบตั้งโต๊ะ EBA12 (Hettich Zentrifugen)

2. อุปกรณ์

- 2.1. 0.1-1 ul Graduated multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.2. 0.1-1 ul Long reach multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.3. 1-200 µl multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.4. 100-1000 µl multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.5. 0.1-3 Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.6. 2-20 µl Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.7. 10-100 µl Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.8. 100-1000 µl Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.9. 0.2 ml µltra Amp PCR products PCR tubes (Sorenson, Bioscience)
- 2.10. 0.65 ml Safeseal microcentrifuge tubes (Sorenson, Bioscience)
- 2.11. 1.7 ml Safeseal microcentrifuge tubes (Sorenson, Bioscience)
- 2.12. 2.0 ml Safeseal microcentrifuge tubes (Sorenson, Bioscience)
- 2.13. Disposable conical tubes (NUNC™)
- 2.14. 50 ml Centrifuge tube (CORNING)
- 2.15. 3 ml Pasteur pipettes (Sterilin)
- 2.16. Disposable Serological pipette 10 ml (COSTAR®)
- 2.17. Disposable Serological pipette 5 ml (TPP®)
- 2.18. Safety Cap EDTA K3 Tube 3 ml (VACUETTE)
- 2.19. Safety Cap Plain Tube 4 ml (VACUETTE)
- 2.20. Disposable Syringe 10 ml (NIPRO)
- 2.21. Hypodermic Needle 21GX1½ Thin wall (NIPRO)
- 2.22. Parafilm PM-996 (PECHINEY)

3. สารเคมี

- 3.1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยา ACD
 - 3.1.1. Trisodium citrate (SIGMA-AIDRICH[®])
 - 3.1.2. Citric acid (SIGMA)
 - 3.1.3. Dextrose (Difco[™] BD)
- 3.2. G 6-PD Test Kit Catalog No. SQMMR500 (R&D DIAGNOSTICS[®])
 - 3.2.1. ผง Reagent code RD7002
 - 3.2.2. Elution/Dilution buffer code RD7001
- 3.3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA ด้วยวิธี Phenol-chloroform
 - 3.3.1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Lysis buffer
 - 3.3.1.1. Sucrose Molecular Grade (USB)
 - 3.3.1.2. Triton X-100 (SIGMA)
 - 3.3.1.3. Magnesium chloride hexahydrate (BIO BASIC INC)
 - 3.3.1.4. Tris (Hydroxymethyl) laboratory reagent grade (Fisher Scientific)
 - 3.3.1.5. HCl (J.T. BAKER)
 - 3.3.2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Proteinase K buffer
 - 3.3.2.1. Sucrose Molecular Grade (USB)
 - 3.3.2.2. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Plusone[®] Amersham Biosciences)
 - 3.3.2.3. NaCl (UNIVAR)
 - 3.3.2.4. Sodium citrate (SIGMA)
 - 3.3.2.5. HCl (J.T. BAKER)
 - 3.3.2.6. Sodium dodecyl sulphate (GE Healthcare)
 - 3.3.3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SE buffer
 - 3.3.3.1. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Plusone[®] Amersham Biosciences)
 - 3.3.3.2. NaOH (MERCK)

- 3.3.3.3. NaCl (UNIVAR)
- 3.3.4. Absolute ethanol (MERCK)
- 3.3.5. Isopropanol(Isopropyl alcohol), Biotechnology Grade (MERCK)
- 3.3.6. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1)
 - 3.3.6.1. Saturated Phenol (Amresco)
 - 3.3.6.2. Chloroform (RCL labscan)
 - 3.3.6.3. Isoamyl alcohol (CARLO ERBA)
- 3.3.7. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Proteinase K
 - 3.3.7.1. Tris (Hydroxymethyl) laboratory reagent grade (Fisher Scientific)
 - 3.3.7.2. HCl (J.T. BAKER)
 - 3.3.7.3. CaCl₂ (MERCK)
 - 3.3.7.4. 50 % Glycerol (MERCK)
- 3.4. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
 - 3.4.1. 10 mM dNTP mix PCR Grade (Invitrogen)
 - 3.4.2. 10X PCR buffer (RBC Bioscience)
 - 3.4.3. 50 mM MgCl₂ (RBC Bioscience)
 - 3.4.4. Taq Polymerase (RBC Bioscience)
- 3.5. สารเคมีที่ใช้สำหรับ Gel electrophoresis
 - 3.5.1. 10X TBE buffer (Bio-RAD)
 - 3.5.2. 100 bp Sharp DNA marker (RBC Bioscience)
 - 3.5.3. 6x loading buffer (RBC Bioscience)
 - 3.5.4. Agarose low EEO, Molecular Biology Grade (Research Organics)
 - 3.5.5. Ethidium bromide solution (Promega)
 - 3.5.6. 29% Acrylamide + 1% N,N' methylenebisacrylamide (Bio-RAD)
 - 3.5.7. Ammonium persulfate (Pharmacia Biotech)
 - 3.5.8. TEMED (Bio-RAD)

3.6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR-RFLP

- 3.6.1. *Hind*III (Fermentas)
- 3.6.2. (10X) Buffer R (Fermentas)
- 3.6.3. *Xba*I (Fermentas)
- 3.6.4. (10X) Buffer Tango (Fermentas)
- 3.6.5. *Hha*I (Fermentas)
- 3.6.6. *Afl*III (Fermentas)
- 3.6.7. (10X) Buffer O (Fermentas)
- 3.6.8. *Nde*I (Fermentas)
- 3.6.9. *Bst*EII (Fermentas)
- 3.6.10. *Pst*I (Fermentas)
- 3.6.11. *Mbo*II (Fermentas)
- 3.6.12. (10X) Buffer B (Fermentas)
- 3.6.13. *Bcl*I (Fermentas)
- 3.6.14. (10X) Buffer G (Fermentas)
- 3.6.15. *Nla*III (Fermentas)

3.7. HI-YIELD GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit Cat No. YDF300 Lot No.

PG-913-09362 (RBC Bioscience)

- 3.7.1. DF buffer Lot.No.SG-401-09357 (RBC Bioscience)
- 3.7.2. Wash buffer Lot.No.SG-305-09357 (RBC Bioscience)
- 3.7.3. Elution buffer Lot.No.SG-306-09357 (RBC Bioscience)

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม สารละลาย Acid citrate dextrose (ACD) ปริมาตร 300 ml

ชั่ง	Trisodium citrate	3.96	g
	Citrate acid	1.44	g
	Dextrose	4.20	g

ละลายสารทั้ง 3 ชนิด ในน้ำกลั่น 300 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. การเตรียม Lysis buffer (0.32 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂ และ 1% Triton X-100) ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง	Sucrose	109.536	g
	MgCl ₂	1.0165	g
ตวง	1% Triton X-100	100	ml
ชั่ง	Tris	1.199286	g

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 700 ml และปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.5

จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 990 ml

นำ 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂ และ 1% Triton X-100 ที่เตรียมไว้มาผสมและละลายเข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3. การเตรียม Proteinase K digestion buffer (27% Sucrose, 1mM EDTA, 10X SSC และ 1% SDS) ปริมาตร 400 ml

27% Sucrose

ชั่ง	Sucrose	108	g
------	---------	-----	---

1mM EDTA

ชั่ง	EDTA	0.148896	g
------	------	----------	---

10X SSC (NaCl และ Sodium citrate) ปริมาตร 100 ml

ชั่ง	NaCl	8.765	g
	Sodium citrate	4.41	g
	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	80	ml

ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml

ดังนั้น ปิเปต 10X SSC มา 40 ml

1% SDS

ชั่ง	SDS	4	g
------	-----	---	---

นำ Sucrose, EDTA, 10X SSC และ SDS ที่เตรียมไว้มาผสมกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 400 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

4. การเตรียม SE buffer (0.024 M EDTA pH 8.0 และ 0.075 M NaCl) ปริมาตร 250 ml

0.024 M EDTA pH 8.0

ชั่ง	EDTA	2.23344	g
	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	200	ml

ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 250 ml

0.075 M NaCl

ชั่ง	NaCl	1.09575	g
------	------	---------	---

ผสมกับ 0.024 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 250 ml ที่เตรียมไว้ ลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

5. การเตรียม 70% Ethanol ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง	Absolute ethanol	700	ml
	น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	300	ml

ผสมกัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

6. การเตรียม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง	Phenol	500	ml
	Chloroform	480	ml
	Isoamyl alcohol	20	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดที่หุ้มฟอยล์ เพื่อกันแสงที่อุณหภูมิ 4 °C

7. การเตรียม Proteinase K (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM CaCl₂ และ 50%Glycerol) ปริมาตร 100 ml

10 mM Tris-HCl pH 7.5

ชั่ง	Tris	0.12114	g
	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	30	ml

ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml

20 mM CaCl₂

ชั่ง	CaCl ₂	0.22198	g
------	-------------------	---------	---

50%Glycerol

ตวง	50%Glycerol	50	ml
-----	-------------	----	----

ผสม 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM CaCl₂ และ 50% Glycerol เข้าด้วยกัน เก็บที่
อุณหภูมิ -20 °C

8. การเตรียม 2 % Agarose gel

ชั่ง	Agarose gel	0.4	g
	ละลายใน 1X TBE buffer	20	ml
ให้ความร้อนจนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ tray รอให้เจลแข็งตัว			
สำหรับการเตรียมเจลขนาดใหญ่			

ชั่ง	Agarose gel	0.6	g
	ละลายใน 1X TBE buffer	30	ml
ให้ความร้อนจนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ tray รอให้เจลแข็งตัว			

9. การเตรียม 10 % Ammonium persulfate

ชั่ง	Ammonium persulfate	0.5	g
	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	5	ml

10. การเตรียม 8% Acrylamide gel ปริมาตร 7 ml

ปิเปต	29 % Acrylamide + 1% N,N' methylenebisacrylamide	1.862	ml
	น้ำกลั่น	4.389	ml
	(10X) TBE buffer	0.7	ml
	10 % Ammonium persulfate	49	μl
	TEMED	5.6	μl

11. การเตรียม 12% Acrylamide gel ปริมาตร 7 ml

ปิเปต	29 % Acrylamide + 1% N,N' methylenebisacrylamide	2.8	ml
	น้ำกลั่น	3.45	ml
	(10X) TBE buffer	0.7	ml
	10 % Ammonium persulfate	49	μl
	TEMED	2.45	μl

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอภากร กาญจนวิทยากุล
วัน เดือน ปี	4 มิถุนายน พ.ศ.2530
เพศ	หญิง
สัญชาติ	ไทย
เชื้อชาติ	ไทย
ศาสนา	พุทธ
E-mail	ar_armyim@hotmail.com
ที่อยู่	45/13 ซอยพระยาพิพัฒน์ ถนนเจริญกรุง แขวงวัดพระยาไกร เขตบางคอแหลม กรุงเทพฯ 10120
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร