

ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนซีเ็กส์ไออาร์เอฟทู ในกลุ่มยีนที่ควบคุมการมองเห็นสี
แดง – เทียว กับการกลายพันธุ์ของยีนจีซีจีพีดีบนโครโมโซมเอ็กซ์คิว 28

นางสาวกาญจนาวดี ประสิทธิ์สา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 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.

GENETIC ASSOCIATION BETWEEN MUTATIONS OF *CXORF2*: INTERCALATED GENE
WITHIN THE RED-GREEN OPSIN CONE PIGMENT GENE TANDEM ARRAY AND *G6PD*
MUTATIONS ON XQ28.

Miss Kanjanawadee Prasittisa

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

กาญจนาวดี ประสิทธิ์สา : ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนซีเอ็กซ์โออาร์เอฟทู ในกลุ่มยีนที่ควบคุมการมองเห็นสีแดง - เขียว กับการกลายพันธุ์ของยีนจีซีทีพีดีบน โครโมโซมเอ็กซ์คิว 28. (GENETIC ASSOCIATION BETWEEN MUTATIONS OF CXORF2: INTERCALATED GENE WITHIN THE RED-GREEN OPSIN CONE PIGMENT GENE TANDEM ARRAY AND G6PD MUTATIONS ON XQ28.) อ.ที่ ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร, 90 หน้า.

ยีน *G6PD* และยีน *OPN1LW/OPN1MW* ตั้งอยู่บนโครโมโซม X ส่วนปลายข้างยาวที่ ตำแหน่ง q28 โดยพบยีน *CXorf2/TEX28* ที่แทรกตัวอยู่ระหว่างยีน *OPN1LW/OPN1MW* ซึ่ง ปัจจุบันยังไม่พบรายงานที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ภาวะตาบอดสี และภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในยีน *CXorf2/TEX28* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ ในการศึกษาความสัมพันธ์แบบ linkage disequilibrium ระหว่างการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* กับภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในยีน *CXorf2/TEX28* และนอกจากนี้ยังศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* กับภาวะตาบอดสีแดง-เขียว และ ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในยีน *CXorf2/TEX28* กับ ภาวะตา บอดสีแดง-เขียวในประชากรชาวกะเหรี่ยง ผลการศึกษาพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6- PD ในชาวกะเหรี่ยง ร้อยละ 14.2 ในเพศชาย และในเพศหญิงพบร้อยละ 4.0 จากการศึกษา อณูพันธุศาสตร์ของยีน *G6PD*, *CXorf2/TEX28* และ *OPN1LW/OPN1MW* พบว่าภาวะ พหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* มีความสัมพันธ์แบบ linkage disequilibrium กับการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* ของยีน *G6PD* ในชาวกะเหรี่ยง ใน ลักษณะที่จะสามารถถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมสู่รุ่นลูกหลานไปพร้อมกัน ($ID^1 = 1$) ใน ขณะเดียวกันพบความชุกของภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในประชากรกะเหรี่ยงเพียงเล็กน้อย คิดเป็น ร้อยละ 0.8-0.9 ซึ่งภาวะตาบอดสีดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับระหว่างการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* ของยีน *G6PD* และภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28*

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์.....ลายมือชื่อ.....

ปีการศึกษา 2554.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5374608530 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: *CXORF2/TEX28/G6PD*/RED-GREEN COLOR BLINDNESS/CHROMOSOME XQ28.

GENETIC ASSOCIATION BETWEEN MUTATIONS OF *CXORF2*: INTERCALATED GENE WITHIN THE RED-GREEN OPSIN CONE PIGMENT GENE TANDEM ARRAY AND *G6PD* MUTATIONS ON XQ28. ADVISOR: CHALISA LOUICHAROEN CHEEPSUNTHORN, PH.D., 90 pp.

G6PD and *OPN1LW/OPN1MW* were identified on chromosome Xq28. Later, *CXorf2/TEX28* was found intercalated in *OPN1LW/OPN1MW*. Up to date, the association between G 6-PD deficiency, color blindness, and *CXorf2/TEX28* polymorphism has not yet been studied. Therefore, this study aims to examine linkage disequilibrium of G6PD Mahidol and 697 bp deletion in *CXorf2/TEX28*, the association between G6PD Mahidol and color blindness, and the association between 697 bp deletion in *CXorf2/TEX28* and color blindness in Karen population. Here I report that Karen has G 6-PD deficiency 14.2% in male and 4.0% in female. From molecular characterization, G6PD Mahidol and 697 bp deletion in *CXorf2/TEX28* is highly frequent in Karen. Allele frequency of G6PD Mahidol and 697 bp deletion in Karen population is 0.13 and 0.45, respectively. In conclusion, polymorphism of 697 bp deletion is strongly associated with G6PD Mahidol and also frequently inherited together ($ID'1 = 1$). Moreover, color blindness was rare in Shaw Karen population (0.8-0.9%) suggesting that there is no clinical correlation between G 6-PD deficiency and color blindness. First of all there is no association between polymorphism of 697 bp deletion in *CXorf2/TEX28* and red-green color blindness.

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

Academic Year: 2011..... Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ทางผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความรู้ คำแนะนำ ประสบการณ์ แนวทางการแก้ปัญหา ความช่วยเหลือทั้งทางด้านงานวิจัยและงานเขียน และความเมตตากรุณาต่อข้าพเจ้าตลอดการวิจัยที่ผ่านมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐฐิติ ประพันธ์วัฒน์ (ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์) รองศาสตราจารย์นายแพทย์ อิศรางค์ นุชประยูร รองศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงกัญญา ศุภปิติพร และอาจารย์ ดร.อาคม ไสงาม (คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์) สำหรับความรู้ คำแนะนำ และความเมตตาต่อข้าพเจ้าสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน สำหรับคำเอื้อเฟื้อและคำแนะนำ ความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างสูงแก่ข้าพเจ้าตลอดการศึกษาในภาควิชาชีวเคมี

ขอขอบคุณดร.เยาวรีย์ กิตติวัลยาววงศ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสำหรับสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติการทดลองงานวิจัยครั้งนี้ และอาสาสมัครชาวกะเหรี่ยงจากหมู่บ้านแม่सान ตำบลแม่สำ อำเภอศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัยที่กรุณายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ต้องขอบคุณแพทย์หญิงฝนทิพ แจ่มแสงและนางสาวนันทพร อังศุวิทยา สำหรับความช่วยเหลือในการไปเก็บตัวอย่างที่จังหวัดสุโขทัย

ขอขอบคุณพี่ๆและเพื่อนๆ ปริญาโทและนิสิตปริญญาเอก ในหน่วยปฏิบัติการอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ ห้อง 828 ชั้น 8 ตึกแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าอย่างเต็มที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาวอภากร กาญจนวิทยากุล เป็นเพื่อนที่คอยร่วมทุกข์ร่วมสุข ฝ่าฟันอุปสรรคในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สกว.

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและญาติสนิท สำหรับความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา ทำให้สามารถทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
2. คำถามของงานวิจัย.....	2
3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
4. สมมติฐาน.....	3
5. คำสำคัญ.....	3
6. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
7. กรอบแนวคิดการวิจัย.....	4
8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 การมองเห็น ภาวะตาบอดสี ยีนที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็นสีและการกลายพันธุ์.....	5
2.1.1 การมองเห็น.....	5
2.1.2 ภาวะตาบอดสี.....	8
2.1.2.1 ภาวะตาบอดสีแดง.....	9
2.1.2.2 ภาวะตาบอดสีเขียว.....	10
2.1.2.3 ภาวะตาบอดสีน้ำเงิน-เหลือง.....	10
2.1.3 การทดสอบภาวะตาบอดสี.....	11
2.1.4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็นสี.....	11

2.1.5 ยีน <i>Chromosome X open reading frame 2 (CXorf2)</i> หรือ <i>Testis-Expressed gene 28 (TEX28)</i>	12
2.1.6 การกลายพันธุ์ของยีน <i>OPN1LW</i> และ <i>OPN1MW</i>	13
2.2 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) บทบาทหน้าที่ พยาธิ - สภาพ ยีน และการกลายพันธุ์.....	15
2.2.1 เอนไซม์กลูโคส 6- ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD).....	15
2.2.2 ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	17
2.2.2.1 อาการทางคลินิกของภาวะพร่องเอนไซม์.....	17
2.2.2.2 ปัจจัยที่ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในผู้พร่องเอนไซม์ G 6- PD	20
2.2.2.3 การรักษา.....	22
2.2.2.4 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	22
2.2.2.5 ที่มาของการเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	23
2.2.2.6 ยีน <i>G6PD</i>	24
2.2.2.7 การกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i>	25
2.3 ความสัมพันธ์ของยีน <i>G6PD</i> กับภาวะตาบอดสี	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
3.1 การคัดเลือกกลุ่มประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	38
3.1.1 กลุ่มประชากร.....	38
3.1.2 ขนาดกลุ่มตัวอย่าง.....	38
3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด.....	39
3.3 การศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	39
3.4 การศึกษาภาวะตาบอดสีแดง – เขียว	39
3.5 การสกัดสารพันธุกรรม.....	40
3.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>G6PD</i> , <i>OPN1LW</i> / <i>OPN1MW</i> และ <i>CXorf2/TEX28</i>	41
3.6.1 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ชนิด <i>G6PD Mahidol</i>	41
3.6.2 การศึกษาภาวะพหุฐานฐาน deletion 697 bp ของยีน <i>CXorf2/TEX28</i>	42

3.6.3 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน <i>OPN1LW</i> และ <i>OPN1MW</i>	43
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	44
3.7.1 คำนวณความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงทั้งชายและหญิง.....	44
3.7.2 คำนวณความชุกของภาวะตาบอดสีในชาวกะเหรี่ยงทั้งชายและหญิง...	44
3.7.3. วิเคราะห์โครงสร้างพันธุ์ประวัติ (Pedigree).....	44
3.7.4 ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล genotyping ตามกฎ Hardy – Weinberg Equilibrium.....	44
3.7.5 วิเคราะห์ความถี่ของอัลลีล (allele frequencies).....	44
3.7.6 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง G6PD Mahidol กับ deletion 697 bp ของยีน <i>CXorf2/TEX28</i>	45
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	46
4.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในประชากรกะเหรี่ยง.....	46
4.1.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD	46
4.1.2 ความชุกของภาวะตาบอดสีแดง-เขียว.....	47
4.2 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของการกลายพันธุ์และภาวะพหุสัณฐานต่างๆ ของยีน <i>G6PD</i> , <i>CXorf2/TEX28</i> และ <i>OPN1LW/OPN1MW</i>	48
4.2.1 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ชนิด <i>G6PD Mahidol</i>	48
4.2.2 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน <i>CXorf2/TEX28</i>	50
4.2.3 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของการกลายพันธุ์ของยีน <i>OPN1LW/OPN1MW</i>	51
4.2.3.1 ตัวอย่างที่มีภาวะตาบอดสีเขียวชนิด Strong deutan.....	51
4.2.3.2 ตัวอย่างที่มีภาวะตาบอดสีแดงชนิด Mild protan.....	53
4.2.3.3 ตัวอย่างที่พบภาวะตาบอดสีทั้งแดงและเขียว	53
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>G6PD</i> , <i>CXorf2/TEX28</i> และ <i>OPN1LW/OPN1MW</i> .	54

4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง G6PD Mahidol กับ 697 bp deletion ของยีน <i>CXorf2/TEX28</i>	54
4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล G6PD Mahidol ภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน <i>CXorf2/TEX28</i> และการกลายพันธุ์ของยีน <i>OPN1LW/OPN1MW</i> ที่ก่อให้เกิดภาวะตาบอดสีแดง-เขียว.....	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล.....	56
รายการอ้างอิง.....	60
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ยาและสารเคมีที่ผู้ป่วยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ควรหลีกเลี่ยง.....	20
2.2	แสดงความหลากหลายของชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในยีน <i>G6PD</i>	27
2.3	แสดง haplotypes ในแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i>	35
3.1	แสดงนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ primer ที่ใช้ในการ amplify ชิ้นส่วนต่างๆในยีน <i>OPN1LW</i> และยีน <i>OPN1MW</i>	43
4.1	ค่าความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในประชากรกะเหรี่ยง.....	47
4.2	แสดงจำนวนชาวกะเหรี่ยงที่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> แบบ Mahidol และความถี่ของลักษณะจีโนไทป์และอัลลีล ของการกลายพันธุ์ <i>G6PD</i> Mahidol.....	49
4.3	แสดงความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ในประชากรกะเหรี่ยง.....	51
4.4	แสดงความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ในประชากรกะเหรี่ยงและชาติพันธุ์อื่นๆ ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ชนิดต่างๆ.....	51

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ภาพแสดงกลุ่มยีนต่างๆบนโครโมโซม X ตำแหน่ง q28.....	5
2.2	(ก.) ภาพตัดขวางของนัยน์ตามนุษย์. (ข.) ส่วนประกอบของเซลล์ตัวรับสัญญาณแสง (light receptor) ทั้ง rod cell และ cone cell.....	6
2.3	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น ของ cone cell.....	7
2.4	ภาพแสดงการส่งสัญญาณจากตัวรับสัญญาณผ่าน G-protein.....	8
2.5	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเซลล์โคนในเพศชายที่มีภาวะตาบอดสีชนิดต่างๆ.	9
2.6	ตัวอย่างของชุดทดสอบ Ishihara.....	11
2.7	แสดงการเรียงตัวและจำนวน exon ของกลุ่มยีน <i>OPN1LW</i> และ <i>OPN1MW</i>	12
2.8	ภาพแสดงการเรียงตัวที่หลากหลายของยีน cone pigment ที่ประกอบด้วย <i>OPN1LW</i> , <i>TEX28(pTEX)</i> , <i>OPN1MW</i> และ <i>TEX28(fTEX)</i>	13
2.9	ตัวอย่างความหลากหลายของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน <i>OPN1LW/OPN1MW</i>	14
2.10	แสดงโครงสร้างแบบไดเมอร์และเตตระเมอร์ของเอนไซม์ G 6-PD.....	16
2.11	แสดงหน้าที่ของเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	17
2.12	แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงในลักษณะต่างๆ.....	19
2.13	ภาพแสดงกลไกหมู่ไพริมิดีน (pyrimidines) ของcovicine ที่อยู่ในถั่วปากอ้า.....	21
2.14	แสดงการกระจายตัวของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทั่วโลก.....	24
2.15	แสดงตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ในยีน <i>G6PD</i> ของมนุษย์.....	26
2.16	แผนที่แสดงบริเวณแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และแผนที่การกระจายตัวของ การกลายพันธุ์แบบ G6PD Mediterranean ที่พบใน Cosanza.....	37
3.1	แสดงชุดทดสอบภาวะตาบอดสีแดง – เขียว.....	40
3.2	แสดงรูปแบบในการออกแบบ primer ในยีน <i>CXorf2/TEX28</i>	42
4.1	แสดงผลการทดสอบในการศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ด้วยวิธี FST.....	46
4.2	แสดงแผ่นทดสอบที่ใช้จำแนกภาวะตาบอดสี.....	48
4.3	แสดงผลการศึกษาการกลายพันธุ์ G6PD Mahidol ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	49
4.4	แสดงการศึกษาลักษณะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ในยีน <i>CXorf2/TEX28</i> ...	50

4.5	แสดงผลจากการทำ PCR ของบริเวณ promoter ของยีน <i>OPN1MW</i>	52
4.6	แสดงผลจากการทำ direct sequencing ในบริเวณ exon4 ของยีน <i>OPN1LW/OPN1MW</i>	52
4.7	แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของตาบอดสีเขียวชนิด strong deutan.....	53
4.8	แสดงผลจากการทำ direct sequencing ของยีน <i>OPN1LW/OPN1MW</i>	53
4.9	แสดงผลจากการทำ direct sequencing บริเวณ exon5 ของยีน <i>OPN1LW/OPN1MW</i>	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

cGMP	= cyclic Guanosine Monophosphate
<i>OPN1LW</i>	= opsin 1 long wavelength gene
<i>OPN1MW</i>	= opsin 1 middle wavelength gene
Kb	= kilo base pairs
λ_{max}	= maximum wave length (Lambda max)
Ser	= serine (amino acid)
Tyr	= tyrosine (amino acid)
Ala	= alanine (amino acid)
Ile	= isoleucine (amino acid)
Thr	= threonine (amino acid)
Phe	= phenylalanine (amino acid)
Asp	= aspartic acid (amino acid)
Met	= methionine (amino acid)
Gly	= glycine (amino acid)
His	= histidine (amino acid)
Val	= valine (amino acid)
nm	= nanometer
<i>CXorf2</i>	= chromosome X open reading frame 2 gene
<i>TEX28</i>	= testis-Expressed gene 28 gene
<i>fTEX; fCXorf2</i>	= functional CXorf2 gene
<i>pTEX; pCXorf2</i>	= pseudo CXorf2 gene
TKT	= transketolase-related
G 6-PD	= enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase
<i>G6PD</i>	= glucose-6-phosphate dehydrogenase gene
PPP	= pentose phosphate pathway
NADP	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	= reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

TPNH	= reduced triphosphopyridine nucleotide
G-6-P	= glucose-6-phosphate
GSHPx	= glutathione peroxidase
GSH	= glutathione
H ₂ O ₂	= hydrogen peroxide
HDN	= hemolytic disease of the newborn
NNJ	= neonatal Jaundice
umol/min	= micro mol per min
IU/gHb	= international unit per gram haemoglobin
UV	= ultraviolet
Xq28	= chromosome X band q28
G	= guanine
C	= cytosine
T	= thymine
A	= adenine
WHO	= world Health Organization
Med1	= G6PD Mediterranean type 1
Med2	= G6PD Mediterranean type 2
F8C	= coagulation factor VIIIc
LD	= linkage disequilibrium
ACD	= acid citrate dextrose
EDTA	= ethylenediaminetetraacetate
DNA	= deoxyribonucleic acid
FST	= fluorescence spot test
ul	= micro liter
rpm	= revolutions per minute

TCF = temperature correction factor

Hb = hemoglobin

M = molar (mol/L)

NaCl = sodium chloride

Gel Doc = gel documentation

EtBr = ethidium bromide

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะตาบอดสี (color blindness) เป็นความบกพร่องในการจำแนกสีของตา ทำให้ความสามารถในการมองเห็นสีผิดปกติไป โดยปกติแล้วการมองเห็นสีต่างๆ นั้นต้องอาศัยตัวรับแสงหรือตัวรับสัญญาณ (receptor) บนเซลล์รูปกรวย (cone cell) ที่จอตา (retina) ซึ่งตัวรับสัญญาณนั้นมี 3 ชนิดตามการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ เช่น 420 นาโนเมตร (สีน้ำเงิน), 530 นาโนเมตร (สีเขียว) และ 560 นาโนเมตร (สีแดง) (1) ภาวะตาบอดสีที่พบได้บ่อยๆ มักจะเป็นตาบอดสีเขียว (Deuteranopia) และสีแดง (Protanopia) (2) โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวรับสัญญาณ ส่งผลให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงของตัวรับสัญญาณบกพร่อง ยีนตัวรับสัญญาณคลื่นแสง ช่วงความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (สีแดง) คือ *OPN1LW* (opsin 1 long wave) และยีนตัวรับสัญญาณคลื่นแสง ช่วงความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (สีเขียว) คือ *OPN1MW* (opsin 1 middle wave) ทั้งสองยีนอยู่บนโครโมโซม X ส่วนปลาย q28 โดยมียีน *CXorf2* (Chromosome X open reading frame 2) หรือ *TEX28* (Testis-Expressed gene 28) แทรกอยู่ ซึ่งยีน *CXorf2/TEX28* ยังไม่ทราบหน้าที่ แต่มีภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) 697 bp deletion นอกจากนี้ในบริเวณ Xq28 ส่วน downstream ของยีน *OPN1MW* ไปประมาณ 298 kb ยังพบยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์กลูโคส 6- ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) (3)

เอนไซม์ G 6-PD เป็นเอนไซม์ในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway : PPP) สร้างนิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (NADPH) (4) เพื่อช่วยรักษาสมดุลของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และรีดักชัน (reduction) ภายในเซลล์ การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* เป็นสาเหตุของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ส่งผลให้เกิดอาการดีซ่าน (jaundice) และโลหิตจางเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia) (5) เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น การติดเชื้อ การได้รับยาต้านมาลาเรีย และการกินถั่วปากอ้า โดยลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับเชื้อชาติ ภูมิภาค วัฒนธรรม และภาษา ทั้งนี้การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี 2 ชนิด คือ ชนิดมหิดล (G6PD Mahidol: 487G → A) ในชาวมอญ (6) และมอญ (7) และ ชนิดเวียงจันทน์ (G6PD Viangchan: 871G → A) ในชาวไทย (8) เขมร (6, 9, 10) และลาว (11) ส่วนการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยมากในทวีปยุโรป เช่น ในกลุ่มชาวเมดิเตอร์เรเนียนนั้นเป็นการกลายพันธุ์ชนิดเมดิเตอร์เรเนียน (G6PD Mediterranean: 563C → T) โดยมี

รายงานที่ชาวเมดิเตอร์เรเนียนที่มาจากฝั่งทะเล Tyrrhenian ทุกคนที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ชนิด G6PD Mediterranean 1 จะพบภาวะตาบอดสีเขียว (Deuteranopia) ร่วมด้วย (3) ในขณะที่การศึกษาทางพันธุศาสตร์ของยีน *G6PD* ในกลุ่มประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปัจจุบันนั้น มีเพียงการศึกษาความหลากหลายของการกลายพันธุ์และ haplotype ของ single nucleotide polymorphisms (SNPs) เท่านั้น ยังไม่พบงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพร่องเอนไซม์กับกลุ่มยีนอื่นๆ บริเวณ Xq28 เช่น กลุ่มยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวรับสัญญาณคลื่นแสงของเซลล์โคนที่เรตินา นอกจากนี้จากการศึกษาภาวะ positive selection ของรายงานก่อนหน้านี้ (12) (ข้อมูลยังไม่มีเปิดเผย) พบว่า G6PD Mahidol น่าจะมีความสัมพันธ์กับภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ที่ intron 3 ของ *CXorf2/TEX28* ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol กับภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ที่ intron 3 ของ *CXorf2/TEX28* ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะตาบอดสีและภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่จะเป็นประโยชน์ในการอธิบายความสัมพันธ์ และวิวัฒนาการทางพันธุศาสตร์ของกลุ่มยีนบนโครโมโซม Xq28

1.2 คำถามงานวิจัย

1. G6PD Mahidol มีความสัมพันธ์เชิงพันธุศาสตร์กับภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* หรือไม่
2. ภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* มีความสัมพันธ์กับภาวะตาบอดสีแดง – สีเขียว หรือไม่
3. G6PD Mahidol มีความสัมพันธ์กับภาวะตาบอดสีแดง-เขียว หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุศาสตร์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แบบ G6PD Mahidol กับภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28*
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* กับภาวะตาบอดสีแดง - สีเขียว
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แบบ G6PD Mahidol กับภาวะตาบอดสีแดง - เขียว

1.4 สมมติฐาน

1. G6PD Mahidol น่าจะมีความสัมพันธ์เชิงพันธุศาสตร์กับภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28*
2. ภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* น่าจะมีความสัมพันธ์กับภาวะตาบอดสีแดง - เขียว
3. G6PD Mahidol น่าจะมีความสัมพันธ์กับภาวะตาบอดสีแดง - เขียว

1.5 คำสำคัญ

CXorf2

TEX28

G6PD

Red-green color blindness

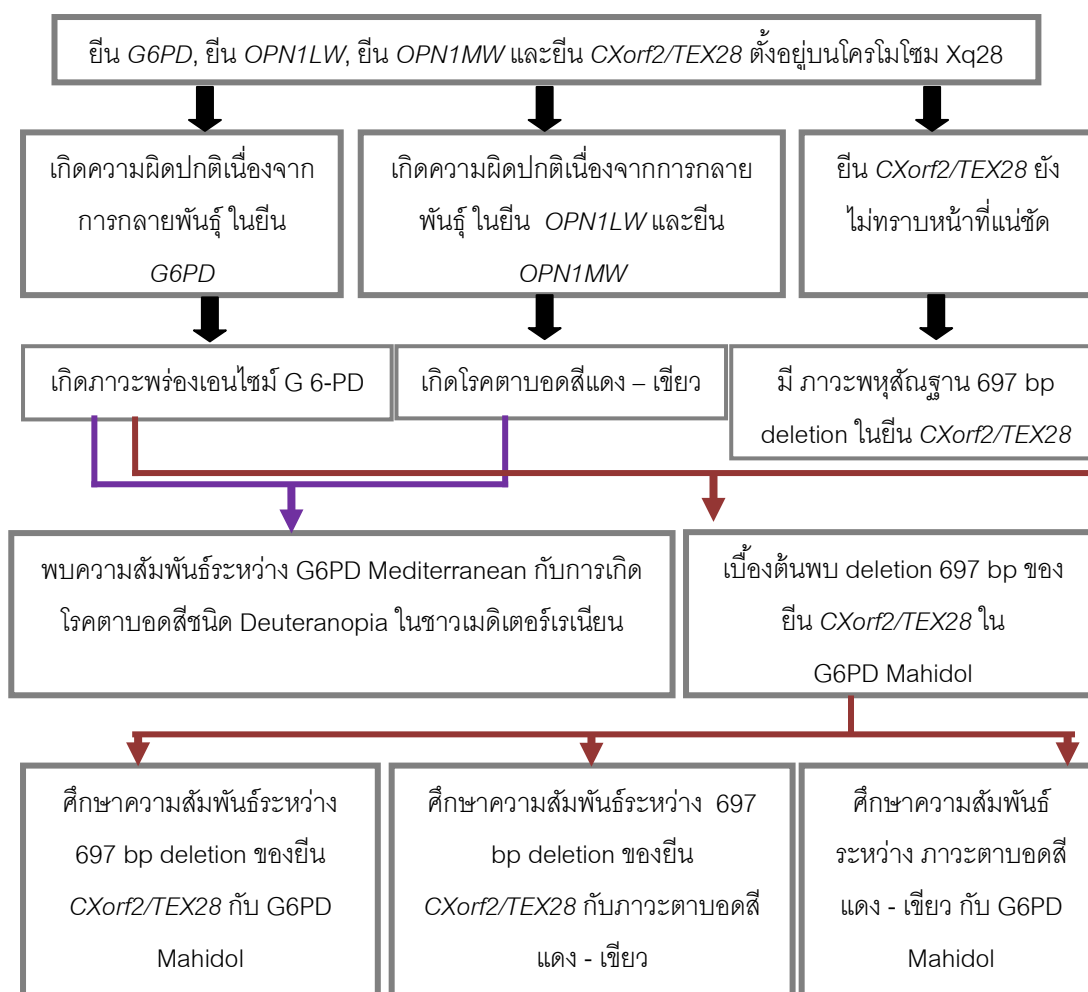
Chromosome Xq28

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. ภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเป็นความแตกต่างกันของลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ของ DNA ใน genome ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต ภาวะพหุสัณฐานนี้พบได้มากมายเป็นล้านตำแหน่งใน genome มนุษย์ โดยมีหลายสาเหตุ เช่น การเกิดกลายพันธุ์ในลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเดียว (point mutation) หรือเปลี่ยนชนิดลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ไป (substitution mutation) และการขาดหายไปหรือการเพิ่มขึ้นมาของนิวคลีโอไทด์บางส่วนในยีน (deletion/insertion)

2. Linkage disequilibrium (LD) คือ ความสัมพันธ์แบบไม่สุ่มระหว่างอัลลีลใน 2 ตำแหน่ง (loci) หรือมากกว่า โดยที่ตำแหน่งของอัลลีลนั้นจะอยู่บนโครโมโซมเดียวกันหรือไม่ก็ได้ ปัจจัยที่จะมีผลต่อ linkage disequilibrium ได้แก่ การคัดเลือกตามกฎธรรมชาติ (selection) อัตราการ recombination อัตราการกลายพันธุ์ genetic drift การเลือกคู่ (non-random mating) และขนาดของประชากร

1.7 กรอบแนวคิดการวิจัย



1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการอธิบายความสัมพันธ์และวิวัฒนาการทางพันธุศาสตร์ของกลุ่มยีนบนโครโมโซม Xq28 เช่น ยีน *G6PD* กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *CXorf2/TEX28*

2. สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยนี้ในงานประชุมทางวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครโมโซมเพศ X ของมนุษย์ส่วนปลาย (telomeric region) บริเวณ Xq28 ประกอบด้วยยีนต่างๆ อาทิเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็นสี (color vision) และยีนสร้างเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) ดังภาพที่ 2.1 โดยที่แต่ละยีนต่างก็มีบทบาทหน้าที่ที่แตกต่างกัน



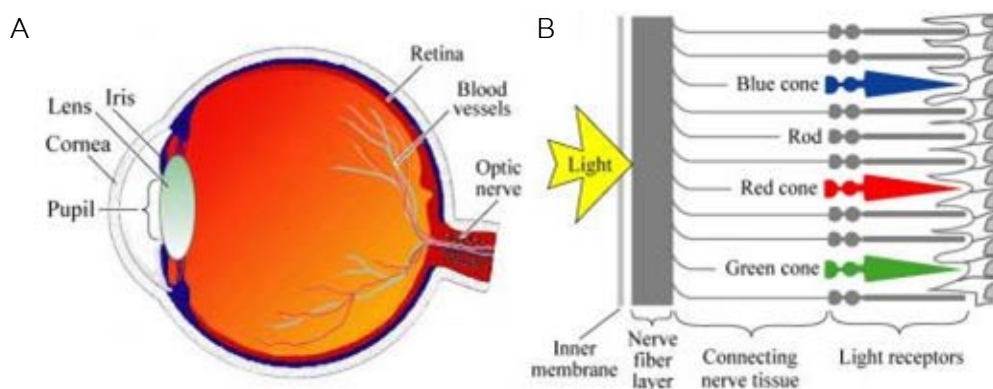
ภาพที่ 2.1: ภาพแสดงกลุ่มยีนต่างๆ บนโครโมโซม X บริเวณตำแหน่ง q28 ประกอบด้วยยีน G6PD ยีนที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็นสีและยีน factor VIII (5)

2.1 การมองเห็น ภาวะตาบอดสี ยีนที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็นสี และการกลายพันธุ์

2.1.1 การมองเห็น (vision)

การมองเห็นของมนุษย์เกิดจากการที่แสงตกกระทบวัตถุ แล้วสะท้อนไปยังกระจกตา ผ่านแก้วตา (cornea) ม่านตา (iris) ลูกตา (lens) แล้วทำให้เกิดภาพขึ้นที่บริเวณจอตา (retina) ซึ่งบริเวณนี้ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณหรือตัวรับแสงอยู่ โดยมีสัญญาณประสาทผ่านไปตามเส้นประสาทตา (optic nerve) ไปสู่ศูนย์กลางของการรับภาพที่สมอง (13, 14) ดังภาพที่ 2.2

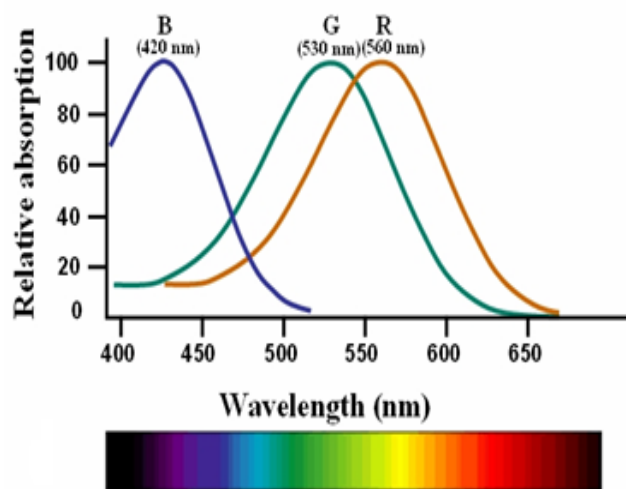
กลุ่มเซลล์บน retina มี 2 ชนิด คือ เซลล์รูปกรวย (cone cell) และ เซลล์รูปแท่ง (rod cell) โดยความไวต่อแสงของเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกัน rod cell มีรงควัตถุ (pigment) ที่ไวต่อแสงมาก จึงถูกใช้ในเวลากลางคืน ส่วน cone cell มีสารสีที่ไวต่อแสงน้อยกว่า จึงถูกใช้ในเวลากลางวันที่มีแสงมาก



ภาพที่ 2.2: ภาพ A แสดงภาพตัดขวางของนัยน์ตามนุษย์ ภาพ B แสดงส่วนประกอบของเซลล์ตัวรับสัญญาณแสง (light receptor) ทั้ง rod cell และ cone cell (15)

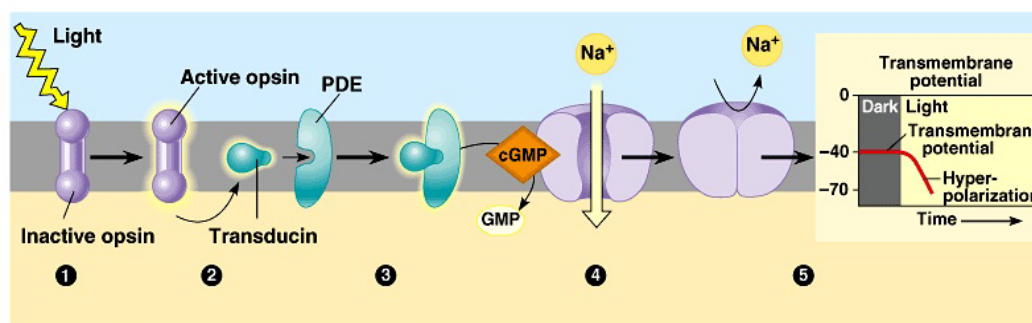
1. Rod cell มีลักษณะเป็นแท่งยาวๆ เรียงตัวกันอยู่หลายล้านเซลล์ โดยที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มีโปรตีนโรดอปซิน (rhodopsin) เรียงตัวอยู่ Rhodopsin ประกอบด้วยออปซิน (opsin) และเรตินอล (retinal) ซึ่งเป็นสารที่มีความไวต่อแสงมาก (16) แต่เนื่องจาก rod cell หลายพันตัวจะต่อกับเส้นประสาท 1 เส้นเท่านั้น จึงทำให้ความคมชัดของการมองเห็นภาพต่ำมาก ภาพที่เกิดจาก rod cell จะไม่มีสีใดๆ ทั้งสิ้น โดยเกิดแต่ภาพขาวดำเท่านั้น ดังนั้น rod cell จะช่วยในการมองเห็นภาพหยابๆ ไม่บอกรายละเอียดและสีของภาพ ซึ่งทำงานได้ดีในเวลากลางคืน (14, 17)

2. Cone cell ลักษณะของเซลล์เป็นแท่งทู่ๆ ที่เรียงตัวกันอย่างหนาแน่นในบริเวณ retina (17) ประกอบด้วยเซลล์ตัวรับสัญญาณ 3 ชนิด ตามการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ 3 กลุ่ม ได้แก่ สีน้ำเงิน (blue cone, “S” cone) หรือช่วงความยาวคลื่นสั้น (420 นาโนเมตร), สีเขียว (green cone, “M” cone) หรือช่วงความยาวคลื่นช่วงกลาง (530 นาโนเมตร) และ สีแดง (red cone, “L” cone) หรือช่วงความยาวคลื่นยาว (560 นาโนเมตร) (14, 18) เราสามารถมองเห็นสีต่างๆ ได้จากการผสมสีจากตัวรับสัญญาณของทั้งสามสีอย่างเหมาะสม ทำให้ตาเราสามารถมองเห็นสีในช่วงที่กว้างขึ้น ช่วงความยาวคลื่นของตามนุษย์ที่สามารถมองเห็นได้ (visible wavelength) อยู่ในช่วง 400-700 นาโนเมตร (19) ดังภาพที่ 2.3 โดย cone cell มีหน้าที่ในการบอกรายละเอียดและสีของภาพที่เห็นได้อย่างชัดเจน ดังนั้น cone cell จึงทำงานได้ดีในเวลากลางวันทำให้เห็นภาพได้อย่างชัดเจน (14, 17)



ภาพที่ 2.3: สเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นของ cone cell (cone photopigment) ทั้งสามชนิดในระบบ trichromatic ของการมองเห็นสีในมนุษย์, B (blue cone) คือช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงของตัวรับสัญญาณสีน้ำเงิน, G (green cone) คือช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงของตัวรับสัญญาณสีเขียว และ R (red cone) คือช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงของตัวรับสัญญาณสีแดง (14)

กระบวนการส่งสัญญาณที่ทำให้เกิดการมองเห็น ต้องอาศัยการเปลี่ยนสัญญาณแสงที่มากระตุ้นตัวรับสัญญาณ (receptor หรือ opsin) ทำให้ opsin ส่งสัญญาณ (signal transduction) ผ่าน G-protein แล้วกระตุ้นอย่างเป็นลำดับให้ cGMP-phosphodiesterase ทำงาน ทำให้เปลี่ยน cGMP เป็น GMP ที่ไม่สามารถจับ cGMP-gated cation channel ได้ จึงส่งผลโดยตรงต่อการปิดของ cGMP-gated cation channel เกิดการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์ไฟฟ้า (action potential) ขึ้นในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และส่งสัญญาณไปให้ระบบประสาทเพื่อแปลผลเป็นสีต่างๆ ตามสัญญาณที่ส่งมาจากชนิดของตัวรับสัญญาณ (2, 20) ดังภาพที่ 2.4



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

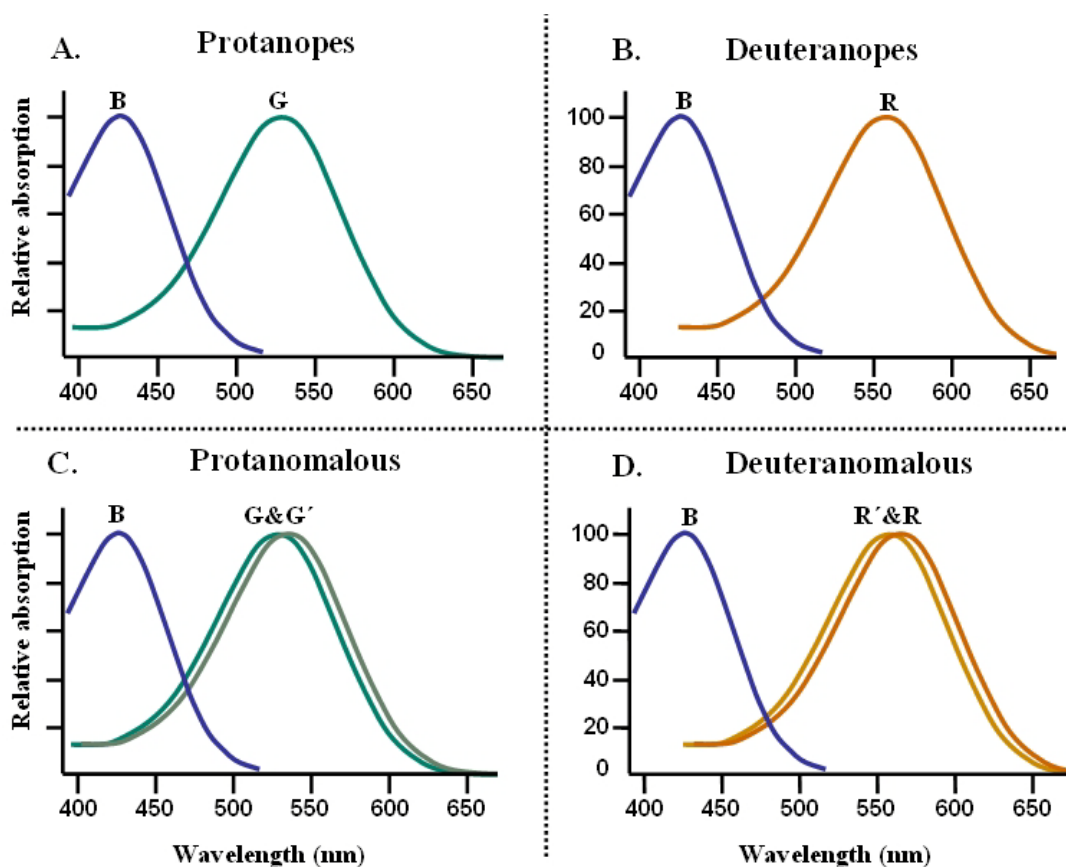
ภาพที่ 2.4: ภาพแสดงการส่งสัญญาณจากตัวรับสัญญาณผ่าน G-protein ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และส่งเป็นสัญญาณศักย์ไฟฟ้าไปยังระบบประสาทเพื่อประมวลผลการมองเห็นสี จากภาพแสดงถึง inactive opsin ได้รับการกระตุ้นจากแสงเป็น active opsin (ขั้นตอนที่ 1) จากนั้น active opsin จะไปกระตุ้น transducin (ขั้นตอนที่ 2) ให้เอนไซม์ phosphodiesterase (PDE) สามารถทำงานได้ เพื่อเปลี่ยน cyclic-GMP (cGMP) เป็น GMP ส่งผลให้ปริมาณ cGMP ลดลง (ขั้นตอนที่ 3) ส่งผลโดยตรงต่อการปิดของ cGMP-gated cation channel (ขั้นตอนที่ 4) เกิดการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์ไฟฟ้า (action potential) (ขั้นตอนที่ 5) (21)

2.1.2 ภาวะตาบอดสี

ภาวะตาบอดสี เป็นความบกพร่องในการจำแนกสีของตา ทำให้ความสามารถในการมองเห็นสีผิดปกติไป โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวรับสัญญาณ จึงทำให้การมองเห็นสีผิดปกติ ภาวะตาบอดสีนั้นแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ ตาบอดสีแดง (protanopia) ตาบอดสีเขียว (deuteranopia) และตาบอดสีน้ำเงิน (tritanopia) โดยภาวะตาบอดสีแดง (protanopia) และสีเขียว (deuteranopia) มักพบได้บ่อย (14, 22) อีกทั้งมีการถ่ายทอดแบบ X-linked เนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ red-green cone อยู่บนโครโมโซมเพศ X จึงทำให้พบมากในเพศชาย (22) จากการศึกษาในกลุ่มประชากรตะวันตก (Caucasians) พบภาวะตาบอดสีแดง - เขียวร้อยละ 8 ในเพศชายแต่พบเพียงร้อยละ 0.5 ในเพศหญิง ในขณะที่ในกลุ่มประชากรแถบแอฟริกาและเอเชียพบเพียงร้อยละ 3-4 ในเพศชาย (14) ส่วนภาวะตาบอดสีน้ำเงิน - เหลืองนั้นพบได้น้อยมาก และไม่ได้มีการถ่ายทอดแบบ sex-linked เช่นเดียวกับภาวะตาบอดสีแดง - เขียว เนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ blue cone นั้นอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 (23, 24)

2.1.2.1 ภาวะตาบอดสีแดง (protan) เกิดจากความผิดปกติของ red cone ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามระดับความรุนแรงและความผิดปกติของ cone cell ดังนี้

- Protanopia หรือ protanopes เป็นตาบอดสีแดงชนิดรุนแรง (strong protan) เนื่องจาก red cone ไม่สามารถทำงานได้ แต่ blue และ green cone ยังคงทำงานปกติ โดยสามารถพบภาวะนี้ได้ประมาณร้อยละ 1 ในชาวตะวันตก (14) ดังภาพที่ 2.5A
- Protanomaly หรือ protanomalous เป็นตาบอดสีแดงชนิดไม่รุนแรง (mild protan) เพราะ red cone ยังสามารถทำงานได้แต่ทำหน้าที่ผิดปกติไป โดยเปลี่ยนช่วงความยาวคลื่นแสงที่ดูดกลืนไปใกล้กับ green cone หรือ green-like cone ทั้งนี้ blue และ green cone ยังทำงานได้ตามปกติ โดยพบประมาณร้อยละ 1 ในชาวตะวันตก (14) ดังภาพที่ 2.5C



ภาพที่ 2.5: สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ cone cell ในเพศชายที่มีภาวะตาบอดสีชนิดต่างๆ ดังนี้ A คือ protanopes, B คือ deuteranopes, C คือ protanomalous และ D คือ deuteranomalous (14)

2.1.2.2 ภาวะตาบอดสีเขียว (deutan) เกิดจากความผิดปกติของ green cone ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามระดับความรุนแรงและความผิดปกติของ cone cell ดังนี้

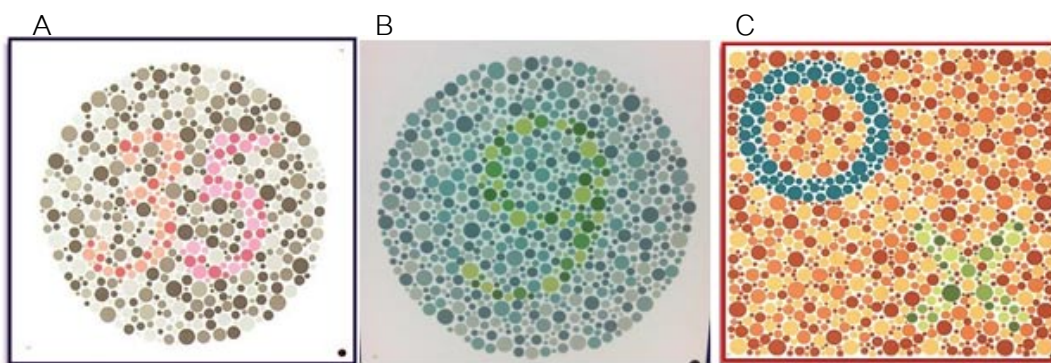
- Deuteranopia หรือ deuteranopes เป็นตาบอดสีเขียวชนิดรุนแรง (strong deutan) เนื่องจาก green cone ไม่สามารถทำงานได้ มีเพียง blue และ red cone ทำงานเท่านั้น โดยพบประมาณร้อยละ 1 ของชาวตะวันตก (14) ดังภาพที่ 2.5B
- Deuteranomaly หรือ Deuteranomalous เป็นตาบอดสีเขียวชนิดไม่รุนแรง (mild deutan) เพราะยังมีการทำงานของ green cone อยู่ แต่ทำหน้าที่ผิดปกติไป โดยมีการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้กับ red cone หรือ red-like cone โดย blue และ red cone ยังทำงานตามปกติ พบประมาณร้อยละ 5 ในชาวตะวันตก (14) ดังภาพที่ 2.5D

2.1.2.3 ภาวะตาบอดสีน้ำเงิน - เหลือง (tritan) เกิดจากความผิดปกติของ blue cone ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามระดับความรุนแรงและความผิดปกติของ cone cell ได้ดังนี้

- Tritanopia หรือ tritanopes เป็นตาบอดสีน้ำเงิน - เหลืองชนิดรุนแรง เนื่องจากไม่มีการทำงานของ blue cone เลย โดยมี red cone และ green cone ทำงานเท่านั้น (14)
- Tritanomaly หรือ tritanolous เป็นตาบอดสีน้ำเงิน - เหลืองชนิดไม่รุนแรง เนื่องจากยังมีการทำงานของ blue cone อยู่ แต่ทำหน้าที่ผิดปกติไป โดยเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงไป ทำให้เปลี่ยนการมองเห็นจากสีน้ำเงินไปเป็นสีเขียว และสีเหลืองไปเป็นสีม่วง (14)

2.1.3 การทดสอบภาวะตาบอดสี

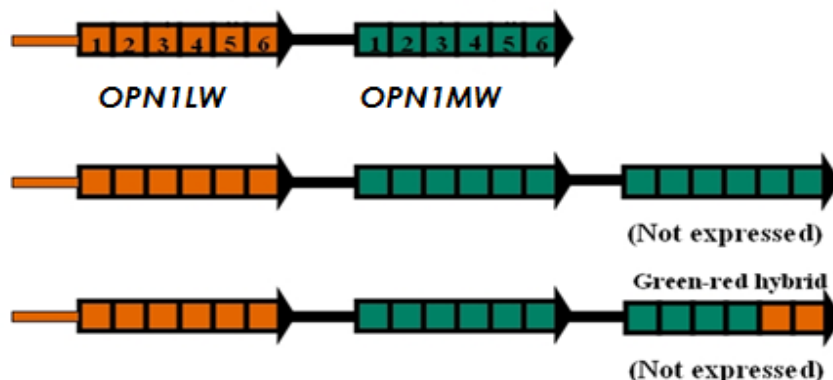
ในปัจจุบันวิธีการทดสอบภาวะตาบอดสีที่นิยม คือ การใช้แผ่นตรวจสอบ Ishihara ดังภาพที่ 2.6 ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว ได้ผลดี และน่าเชื่อถือ เนื่องจากการทดสอบตามแบบมาตรฐาน (25) วิธี Ishihara จะเหมาะสำหรับการทดสอบภาวะตาบอดสีชนิดสีแดง – เขียวและชนิดน้ำเงิน – เหลือง



ภาพที่ 2.6: ตัวอย่างของชุดทดสอบ Ishihara (A) ตัวอย่างแผ่นตรวจสำหรับตาบอดสีแดง (strong protan, mild protan) และตาบอดสีเขียว (strong deutan, mild deutan) (B) ตัวอย่างแผ่นตรวจสำหรับตาบอดสีน้ำเงิน - เหลือง (tritan) (C) ตัวอย่างแผ่นตรวจรูปเลขาคณิตสำหรับเด็ก

2.1.4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็นสี

ยีนของตัวรับสัญญาณคลื่นแสงของ cone cell คือ ยีน *OPN1LW* (*opsin 1 long wavelength*) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวรับสัญญาณคลื่นแสงสีแดง (red cone) และยีน *OPN1MW* (*opsin 1 middle wavelength*) ควบคุมการแสดงออกของตัวรับสัญญาณคลื่นแสงสีเขียว (green cone) ซึ่งทั้งสองยีนเรียงตัวอย่างต่อเนื่อง (tandem array) ในทิศทาง head-to-tail (26) แสดงในภาพที่ 2.7 ยีนทั้งสองมีขนาดประมาณ 15 กิโลเบส (kilobase: kb) ประกอบด้วย 6 exons (2) แสดงในภาพที่ 2.7 และมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน (homologous gene) ถึงร้อยละ 96 (3) โดยพบความแตกต่างของกรดอะมิโนเพียง 15 ตำแหน่งจากกรดอะมิโนทั้งหมด 364 ตำแหน่ง (27) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ทำให้โปรตีนทั้งสองมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน สำหรับมนุษย์พบว่ากรดอะมิโนที่ทำให้ green cone pigment เปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ไปจาก red pigment cone ประมาณ 31 นาโนเมตร มีทั้งหมด 7 ตำแหน่ง ประกอบด้วย Ser116Tyr, Ser180Ala, Ile230Thr, Ala233Ser, Tyr277Phe, Thr285Ala และ Tyr309Phe (27)



ภาพที่ 2.7: แสดงการเรียงตัวและจำนวน exon ของกลุ่มยีน *OPN1LW* (แถบสีเหลี่ยมสีแดง) และ *OPN1MW* (แถบสีเหลี่ยมสีเขียว) โดยหัวลูกศรสีดำแสดงทิศทางการแสดงออก (ดัดแปลงจาก (14))

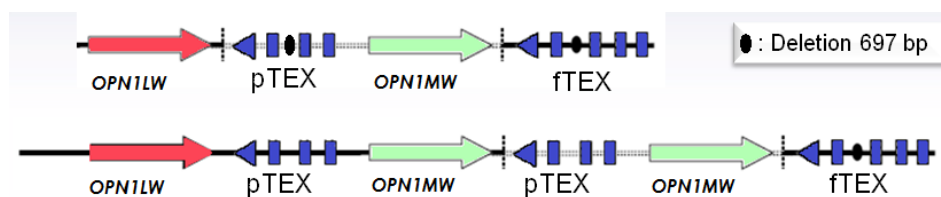
การเรียงตัวของยีนทั้งสองบนโครโมโซม X นั้นประกอบไปด้วย ยีน *OPN1LW* จำนวน 1 ยีนและตามด้วย *OPN1MW* จำนวน 1-3 ยีน ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละคน (28) แต่มีเพียง 2 ยีนแรกภายใน array เท่านั้น คือ ยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* อย่างละ 1 ยีน ที่มีการแสดงออก และสร้างโปรตีนตัวรับสัญญาณภายในเรตินาของมนุษย์ (29) การเรียงตัวของยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* ในมนุษย์จะมีการเรียงตัวในอัตราส่วน 1:1-3 ซึ่งมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ที่มีอัตราส่วนเพียง 1:1 (30) และพบว่ามียีน *Chromosome X open reading frame 2 (CXorf2)* หรือ *Testis-Expressed gene 28 (TEX28)* เรียงตัวอยู่ระหว่างยีนของ cone pigments ซึ่งยังไม่มีการรายงานถึงหน้าที่ที่ชัดเจนของยีนดังกล่าว (31)

2.1.5 ยีน *Chromosome X open reading frame 2 (CXorf2)* หรือ *Testis-Expressed gene 28 (TEX28)*

ยีน *Chromosome X open reading frame 2 (CXorf2)* หรือ *Testis-Expressed gene 28 (TEX28)* เป็นยีนที่แทรกอยู่ระหว่างยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* และระหว่างยีน *OPN1MW* กับยีน *transketolase-related (TKT)* โดยยังไม่มีการวิจัยใดที่บ่งบอกหน้าที่ของยีน *CXorf2/TEX28* ที่ชัดเจน (31) ยีน *CXorf2/TEX28* มีขนาดประมาณ 25.5 กิโลเบส ประกอบด้วย 5 exons จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบ ยีนแท้ (*functional CXorf2: fCXorf2: fTEX*) และ ยีนเทียม (*pseudo CXorf2: pCXorf2: pTEX*) ที่ exon 1 ขาดหายไป ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในผู้มีภาวะตาบอดสีและคนปกติ (32) ดังภาพที่ 2.8 โดยอาจเกิดจากกระบวนการ duplicate ที่ไม่สมบูรณ์

ของยีน *fTEX* ทำให้ exon 1 หายไป นอกจากนี้ยังพบ *Alu* repeat ระหว่าง exon1 และ exon2 ของยีน *TEX28* ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของการหายไปของ exon1 ในยีน *pTEX* (1, 3)

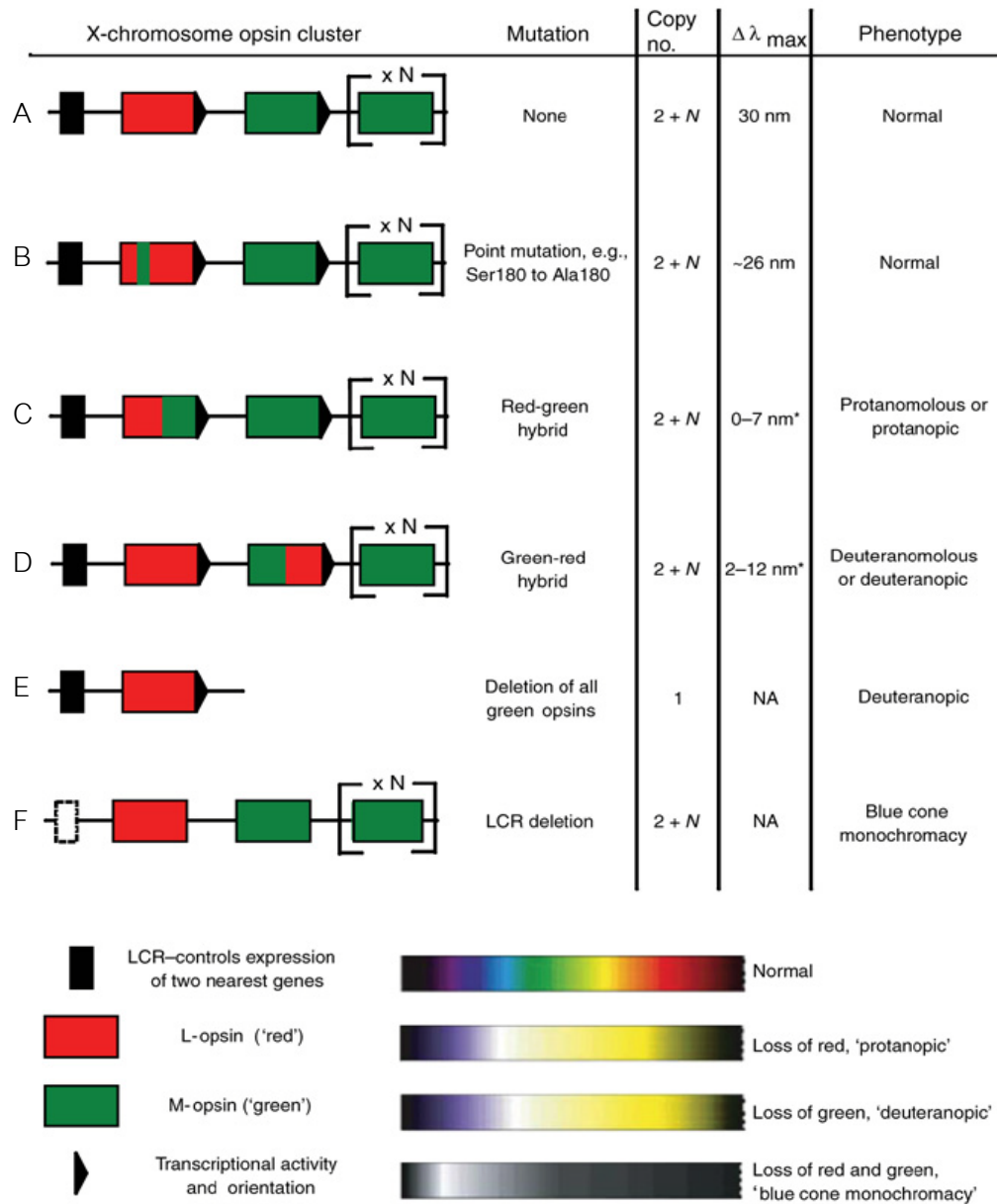
นอกจากนี้ยังพบภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) แบบ 697 bp deletion ที่ intron 3 ของยีน *TEX28* ซึ่งลักษณะพหุสัณฐานนี้สามารถพบได้ทั้งคนปกติและผู้ที่มีภาวะตาบอดสีแดง-เขียว (1)



ภาพที่ 2.8: ภาพแสดงการเรียงตัวที่หลากหลายของยีน cone pigment ที่ประกอบด้วย *OPN1LW*, *TEX28* (*pTEX*), *OPN1MW* และ *TEX28* (*fTEX*) ตามลำดับ ลูกศรสีแดงคือ ยีน *OPN1LW* ลูกศรสีเขียวคือ *OPN1MW* ลูกศรสีน้ำเงินคือ ยีน *TEX28* โดยแบ่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมย่อยๆ แสดงถึงจำนวน exon ที่แตกต่างกันใน *pTEX* และ *fTEX* และจุดสีดำคือ ตำแหน่ง 697 bp deletion ที่ intron 3 ของยีน *TEX28*

2.1.6 การกลายพันธุ์ของยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW*

เนื่องด้วยยีนทั้งสองมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก ประกอบกับเรียงตัวกันอย่างต่อเนื่อง จึงอาจทำให้เกิด homologous recombination หรือ gene conversion ได้ง่าย ในช่วงที่เซลล์แบ่งตัวแบบ meiosis แล้วส่งผลให้เกิดความหลากหลายของจำนวนยีนและการเรียงตัว รวมไปถึงเกิดการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อลักษณะที่แสดงออก (phenotype) การกลายพันธุ์ของยีนกลุ่มนี้มีหลายรูปแบบ (ดังภาพที่ 2.9) แต่ที่พบบ่อยใน deuteranopia และ protanopia มักจะเป็นแบบ deletion และ hybrid ระหว่างสองยีน เช่น green-red hybrid genes ทำให้ยีนขาดหายไปบางส่วนหรือทั้งหมด นอกจากนี้ยังสามารถพบการกลายพันธุ์ชนิด amino acid substitution และการกลายพันธุ์ในส่วนของ LCR (locus control region) ซึ่งเป็นบริเวณที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนรบกวนทั้งคู่ทั้งสองได้เช่นกัน (33, 34)



ภาพที่ 2.9: ตัวอย่างความหลากหลายของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน *OPN1LW/OPN1MW* (L-opsin “red”; สีเหลืองสีแดง / M-opsin “green”; สีเหลืองสีเขียว) (รูปสีเหลืองผืนผ้าสีดำแสดงถึง LCR; โดยเป็นบริเวณที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ให้แสดงออกเพียงแค่สองยีนที่อยู่ใกล้กัน ซึ่งบริเวณที่เป็นลูกศรสีดำในภาพจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการแสดงออกของยีน) แถว A แสดงการเรียงตัวของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ในคนปกติ แถว B แสดงการเรียงตัวของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ในคนที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ในยีน *OPN1LW* แถว C แสดงการเรียงตัวของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ red-green hybrid แถว D แสดงการเรียงตัวของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ

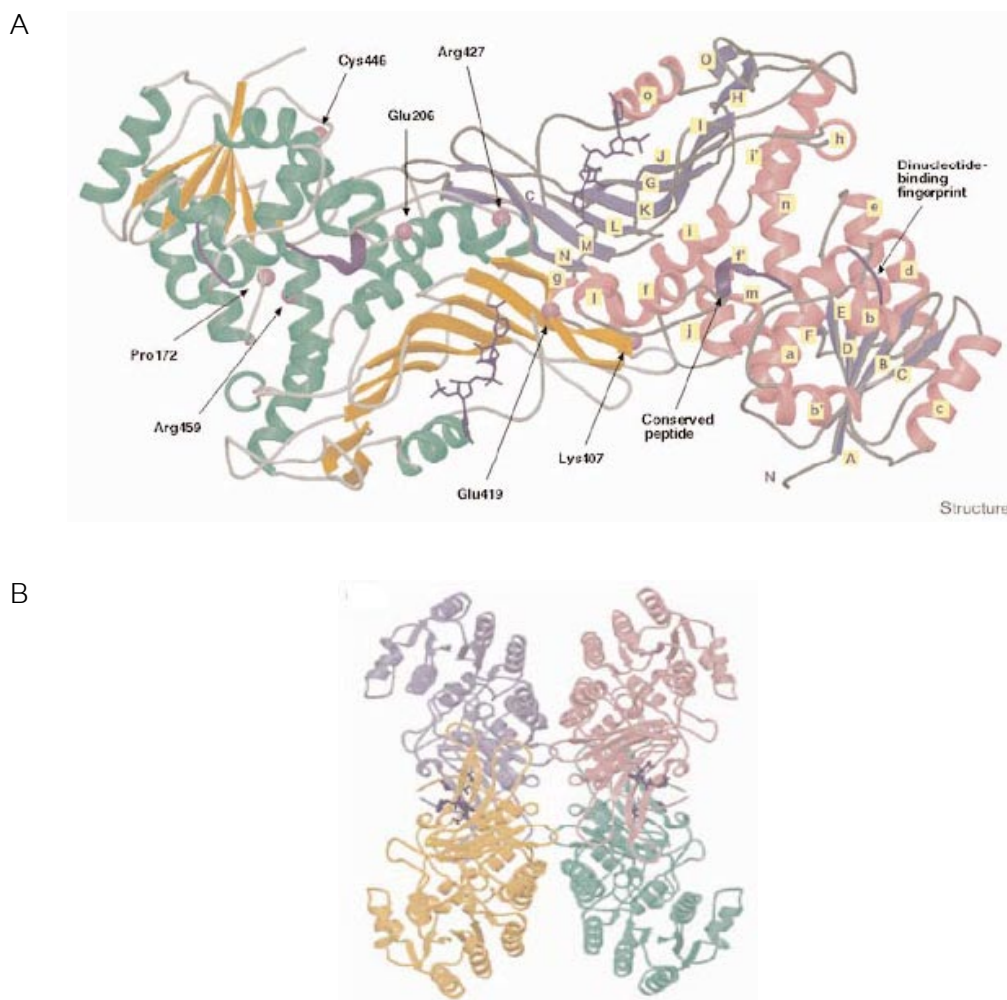
green-red hybrid แถว E แสดงแสดงการเรียงตัวของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *OPN1MW* ไปทั้งยีน แถว F แสดงการกลายพันธุ์แบบ deletion ของบริเวณ LCR ไป (34)

ในขณะเดียวกันบริเวณโครโมโซม X ที่ตำแหน่ง q28 ส่วน downstream ของยีน *OPN1MW* ไปประมาณ 298 kb ยังพบยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) (3) ดังภาพที่ 2.1

2.2 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) บทบาทหน้าที่ พยาธิสภาพ ยีน และการกลายพันธุ์

2.2.1 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD)

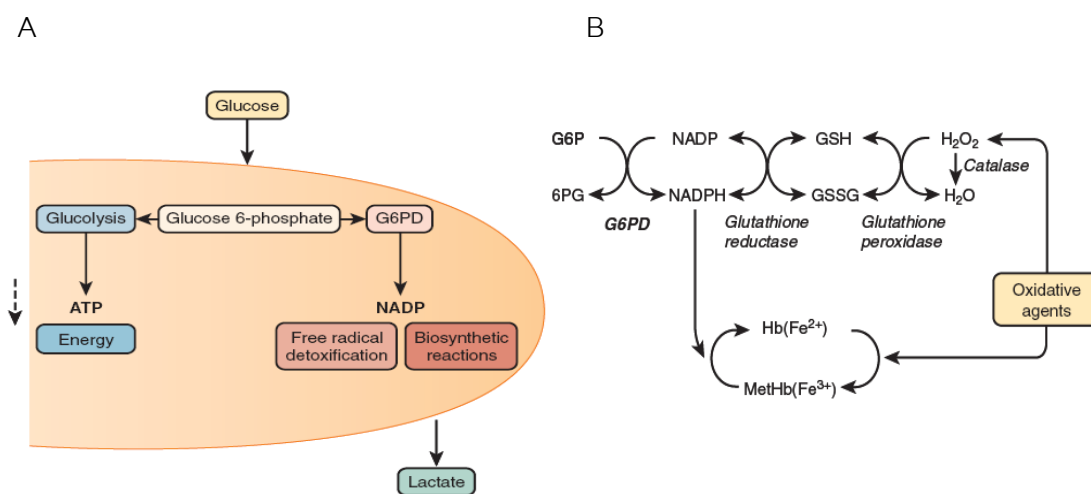
เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphatase dehydrogenase: G 6-PD) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น โพรคาริโอต ยีสต์ โปรโตซัว พืช และ สัตว์ (35-37) โดยจะพบเอนไซม์ G 6-PD ทำงานในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ภาวะที่เอนไซม์ G 6-PD ถูกกระตุ้น (active) ให้ทำงานจะขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างไดเมอร์ (dimer) ดังภาพที่ 2.10A และ เทตระเมอร์ (tetramer) ของเอนไซม์ ดังภาพที่ 2.10B (38, 39) โดยสภาวะดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรด-เบส (pH) และ ionic strength เมื่อค่า pH ต่ำ เอนไซม์มักจะอยู่ในรูป tetramer ในขณะที่เมื่อค่า pH สูงขึ้น เอนไซม์จะอยู่ในรูป dimer ขณะเดียวกันถ้าค่า pH สูงขึ้นมากๆ เอนไซม์จะอยู่ในภาวะไม่ถูกกระตุ้น (inactive) หรือโมโนเมอร์ (monomer) (40) ซึ่งมอนอเมอร์ของเอนไซม์ G 6-PD ประกอบด้วยกรดอะมิโน 515 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 59 กิโลดาลตัน และในแต่ละ monomer จะมีบริเวณที่จับกับ NADP^+ หรือสารตั้งต้น ดังนั้นในขณะที่เอนไซม์ G 6-PD ทำงานจึงพบ NADP^+ ในแต่ละ monomer (4)



ภาพที่ 2.10: ภาพ A แสดงโครงสร้างแบบ dimer ของเอนไซม์ G 6-PD โดยหน่วยย่อยแรกแสดงในสีม่วงและน้ำเงิน ส่วนหน่วยย่อยที่สองแสดงในสีแดงและสีเขียว (39) ภาพ B แสดงโครงสร้างแบบ tetramer ABCD โดยทั้งสี่หน่วยย่อย (subunits) แสดงด้วยสีน้ำเงิน ส้ม เขียว และชมพู และในบริเวณสีน้ำเงินเข้มแสดงถึงบริเวณที่จะจับกับ NADP^+ (38)

เอนไซม์ G 6-PD เป็นเอนไซม์ housekeeping ที่พบในทุกๆ เซลล์ เพราะมีความสำคัญต่อการรักษาสสมดุลปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันภายในเซลล์ (4) โดยเอนไซม์ G 6-PD จะสร้าง NADPH จากการออกซิไดซ์กลูโคส 6-ฟอสเฟต (Glucose 6-phosphate) เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลคโตน (6-phosphogluconolactone) ในขั้นตอนแรกของวิถีเพนโทสโมโนฟอสเฟต (pentose phosphate pathway: PPP) ซึ่งเป็นวิถีเดียวที่สร้าง NADPH ให้กับเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นปฏิกิริยานี้จึงมีความสำคัญต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD จะถูกยับยั้งได้จากระดับของ NADPH ที่สูงขึ้น ดังนั้นอัตราส่วนระหว่าง NADP^+

กับ NADPH จึงเป็นตัวควบคุมการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง(41) เอนไซม์ G 6-PD จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSHPx) และเอนไซม์ Glutathione reductase (GSR,GR) ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์นั้น ถึงแม้ว่าในการกำจัดสารพวกอนุมูลอิสระจะมีเอนไซม์หลายชนิดก็ตาม เช่น เอนไซม์ catalase ที่ถูกสร้างขึ้นอย่างมากในเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่เนื่องจากความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระของเอนไซม์ catalase มีอัตราต่ำมาก ดังภาพที่ 2.11 (42, 43)



ภาพที่ 2.11: ภาพ A แสดงหน้าที่ของเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเมื่อกลูโคส (glucose) ผ่านกระบวนการฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) เกิดเป็นกลูโคส 6-ฟอสเฟต (G6P) ที่เป็นสารตั้งต้นในวิถีหลักๆ 2 วิธี คือ กระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เพื่อสร้างพลังงานให้กับเซลล์ และกระบวนการ pentose phosphate pathway เพื่อสร้างสาร reducing power (NADPH) สำหรับการกำจัดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ภาพ B แสดงการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD และระบบของ Glutathione (GSH) โดยแถวแรกแสดงการป้องกันการทำลายจากสารอนุมูลอิสระ เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยรูปรีดิวซ์ (reduced form) และรูปออกซิไดซ์ (oxidized form) ของ GSH ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงจะขึ้นกับระดับ $NADP^+$ และ NADPH ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ glutathione reductase และ glutathione peroxidase (41, 44)

2.2.2 ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

2.2.2.1 อาการทางคลินิกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงมีวิถีที่สำคัญคือวิถีเพนโทสฟอสเฟต ที่ใช้กำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงอยู่ในภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ทำให้ฮีโมโกลบินเปลี่ยนไปเป็นรูปที่ไม่สามารถขนส่งออกซิเจนได้ (methemoglobin) และเกิดการตกตะกอน methemoglobin มากขึ้น ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า heinz body ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และผนังเซลล์จะถูกทำลายทำให้เกิดภาวะ hemolysis จนกลายเป็นอาการโลหิตจางเฉียบพลันจากเม็ดเลือดแดงแตก (acute hemolytic anemia) ที่พบได้บ่อยๆ ในผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD หรืออาการดีซ่าน (jaundice) ที่พบได้ในเด็กแรกเกิด (44)

2.2.2.1.1 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากเม็ดเลือดแดงแตก (Acute hemolytic anemia)

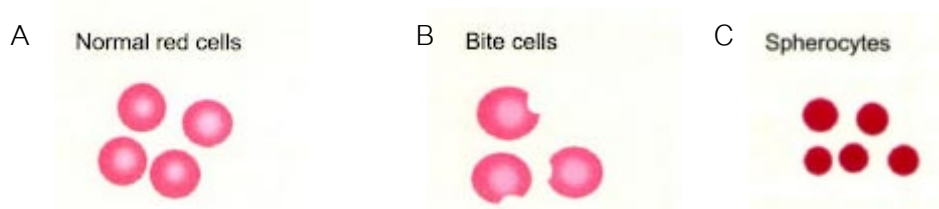
โดยปกติบุคคลที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะไม่แสดงอาการใดๆ ให้เห็นชัดเจน แต่เมื่อร่างกายถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น เช่น การรับประทานถั่วปากอ้า (fava bean) การได้รับยาหรือสารเคมี (ตารางที่ 2.1) อาทิเช่น กลุ่มยาต้านมาลาเรีย จะแสดงอาการโลหิตจางเฉียบพลันจากเม็ดเลือดแดงแตก เช่น ในเด็กที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เมื่อได้รับการกระตุ้นสารอนุมูลอิสระภายใน 24-48 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนเล็กน้อย ปวดท้อง และท้องเสีย นอกจากนี้ในเด็กที่มีภาวะตัวเหลืองซีดหรือดีซ่าน (jaundice) อาจพบอาการปัสสาวะมีสีดำได้ภายใน 6-24 ชั่วโมง (44, 45)

การตรวจสอบภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน สามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยส่องกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากสามารถมองเห็นความผิดปกติได้ชัดเจน ลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างผิดปกติหลายชนิดอยู่รวมกัน (poikilocytes) เช่น ลักษณะ spherocyte ที่พบได้ในคนที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเรื้อรัง และลักษณะ bite cell มักพบได้ในคนที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกฉับพลัน (แสดงในภาพที่ 2.12)

การตรวจสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี heinz bodies โดยการย้อมด้วยสีเมทิล ไวโอเล็ต (methyl violet) แต่จะสามารถมองเห็น heinz body ได้เพียงชั่วคราว เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี heinz bodies จะถูกส่งไปทำลายที่ม้าม จึงทำให้เกิดเซลล์เม็ดเลือดแดงลักษณะแบบ bite cell (46, 47)

การตรวจสอบด้วยการนับจำนวนเรติคูลโลไซต์ (reticulocyte count) เพื่อเป็นการตรวจดูความสามารถในการผลิตเม็ดเลือดแดงจากไขกระดูก โดยถ้าค่าที่วัดได้มีจำนวน

reticulocyte สูงขึ้นหรือมากกว่าปกติ แสดงถึงภาวะโลหิตจาง ร่างกายจึงสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง มาทดแทน (4, 47)



ภาพที่ 2.12: แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงในลักษณะต่างๆประกอบด้วย ภาพ A แสดงเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ภาพ B แสดงความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ bite cell ภาพ C แสดงความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ spherocytes

2.2.2.1.2 ภาวะดีซ่านในเด็กแรกเกิด (neonatal jaundice, NNJ)

จากการศึกษาทางระบาดวิทยา มักพบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในผู้ป่วย NNJ แต่อย่างไรก็ตามไม่ใช่เด็กที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทุกคนจะเป็น NNJ โดยอาการที่แสดงออกมาของภาวะดีซ่านคือ ตาเหลือง ตัวเหลือง ปัสสาวะมีสีเหลืองเข้ม โดยสาเหตุของอาการดังกล่าวเกิดจากการสะสมของบิลิรูบิน (bilirubin) ในเลือดสูงมากกว่าปกติ โดยสารบิลิรูบินเป็นสารสีเหลืองที่เกิดจากกระบวนการทำลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุ ซึ่งสารบิลิรูบินเมื่ออยู่ในกระแสเลือดมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (unconjugated bilirubin) และถูกเปลี่ยนเป็นรูปที่ละลายน้ำได้ (conjugated bilirubin แล้วจึงถูกส่งผ่านระบบน้ำดีไปยังลำไส้เพื่อกำจัดต่อไป โดยภาวะดีซ่านในเด็กแรกเกิดอาจมีสาเหตุมาจากหลายประการเช่น ตับยังทำหน้าที่ได้ไม่เต็มที่เนื่องจากการพัฒนา ยังไม่สมบูรณ์ หรืออาจเกิดขึ้นจากการขาดเอนไซม์ที่ (UDP)-glucuronyltransferases (UGTs) ที่ใช้สำหรับการเปลี่ยนรูปของบิลิรูบินให้สามารถละลายน้ำได้ (47, 48) ดังนั้นเมื่อไม่สามารถกำจัดบิลิรูบินจำนวนมากออกจากร่างกายได้ ทำให้บิลิรูบินเข้าไปในเนื้อเยื่อต่างๆทำให้เห็นลักษณะของอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ได้ (49)

2.2.2.2 ปัจจัยที่ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในผู้พร่องเอนไซม์ G 6-PD

2.2.2.2.1 ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยา (drug induced hemolysis)

การค้นพบความสำคัญของภาวะขาดเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น เริ่มต้นจากการพบผู้ป่วยมาลาเรียที่ได้รับยาต้านมาลาเรียประเภท 8-amino-6-methoxy quinoline เช่น primaquine แล้วเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ซึ่งต่อมาจึงทราบว่าเป็นเพราะผู้ป่วยมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ร่วมด้วย (4, 50) นอกจากนี้ยา primaquine แล้วยังมียา และสารเคมีอื่นๆ ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD ได้ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ยาและสารเคมีที่ผู้ป่วยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ควรหลีกเลี่ยง (51)

ชื่อยาและสารเคมี	
Acetanilid	Primaquine
Furazolidoen(Furoxone)	Sulfacetamide
Methylene Blue	Sulfamethoxazole (Gantanol)
Nalidixic acid(NegGram)	Sulfanilamide
Naphthalene	Sulfapyridine
Niridazole(Ambilhar)	Thiazolesulfone
Isobutyl nitrite	Toluidine blue
Naphthalene	Trinitrotoluene(TNT)
Nitrofurantoin(Furadantin)	Urate oxidase
Phenazopyridine(pyridium)	
Phenylhydrazine	

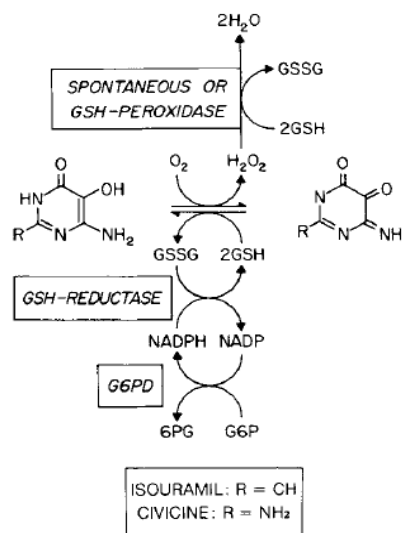
2.2.2.2 ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเนื่องจากการติดเชื้อ (infection induced hemolysis)

ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกสำหรับผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD นั้นไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำจากยาเพียงอย่างเดียว แต่ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำได้จากการติดเชื้อทั้งจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โดยมีการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างโรคไวรัสตับอักเสบบกับภาวะดีซ่านอย่างรุนแรง (4, 52, 53) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกจากการติดเชื้อแล้วส่งผลให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีการตั้งข้อสันนิษฐานไว้ว่าระหว่างที่ร่างกายมีการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (ไวรัส, แบคทีเรีย) ด้วยกระบวนการจับกินของเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytosis) ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์มากขึ้น เป็นเหตุให้เซลล์เม็ดเลือดแดง

อยู่ในสภาวะเครียดมากขึ้น พร้อมทั้งไม่มีเอนไซม์ G 6-PD ช่วยสร้าง NADPH ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (54)

2.2.2.2.3 ภาวะฟาวิซึม (favism)

ลักษณะอาการทางคลินิกของภาวะ favism จะมีความใกล้เคียงกับภาวะเม็ดเลือดแดงเมื่อเกิดจากการติดเชื้อ โดยเมื่อผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD กินถั่วปากอ้า (fava bean) เข้าไปจะทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกได้ เนื่องจากสารที่อยู่ในถั่วปากอ้า ได้แก่ divicine, vicine, isouramil และ covicine โดยสารเหล่านี้กระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น hydrogenperoxide (H_2O_2) ที่สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (53, 55) ดังภาพที่ 2.13 ดังนั้นถ้าผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จึงไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ เซลล์เม็ดเลือดแดงจึงแตกได้ง่ายกว่าในคนปกติ (4, 56, 57)



ภาพที่ 2.13 ภาพแสดงกลไกหมู่ไพริมิดีน (pyrimidines) ของ covicine ในถั่วปากอ้าต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหนี่ยวนำให้เกิด H_2O_2 สูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของกลูตาไทโอนลดลง (55)

2.2.2.2.4 ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเนื่องจากโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ง่ายในผู้ป่วยที่เป็นภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ได้ เนื่องจากระดับกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์มากกว่าปกติ ดังนั้นทำให้เซลล์เกิดการอักเสบเรื้อรังที่ส่งผลต่อความผิดปกติในการหลังอินซูลิน และเกิดการตายของเซลล์ตามมา ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ง่ายกว่าในคนปกติ (58)

2.2.2.3 การรักษา

เมื่อผู้ป่วยเอนไซม์ G 6-PD ได้รับตัวกระตุ้นต่างๆ ที่ก่อให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก จะได้รับการรักษาโดยการให้เลือด ขณะที่ถ้าในผู้ป่วยที่เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกจากการกินถั่วปากอ้า จะได้รับยา desferrioxamine ที่มีคุณสมบัติในการขับธาตุเหล็ก ร่วมกับการให้เลือด เพราะจะทำให้มีระยะ hemoglobinuria สั้นลง และมีระดับฮีโมโกลบินสูงขึ้นเร็วกว่าเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับเลือดเพียงอย่างเดียว (59) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่าวิตามินอีสามารถป้องกันภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันได้ในผู้ป่วยเอนไซม์ G 6-PD (60, 61)

2.2.2.4 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

2.2.2.4.1 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เชิงปริมาณ

เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณที่เป็นวิธีมาตรฐานสากล โดยอาศัยความสามารถในการดูดกลืนแสงของ NADPH ผ่านเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นคำนวณมาจากปริมาณ NADPH ที่เอนไซม์ G 6-PD ผลิตขึ้น ซึ่งมีหน่วยเป็นสากลหรือไมโครโมลในหนึ่งนาที (umol/min) ต่อหนึ่งกรัมของฮีโมโกลบิน (IU/gHb) โดยปกติค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) จะมีค่ามากกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นในการทดสอบควรแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกก่อนทดสอบ เพื่อให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่ตรวจสอบได้เป็นค่าที่เกิดขึ้นจริงในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติมีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD อยู่ในช่วง 7-10 IU/gHb (44, 62-64)

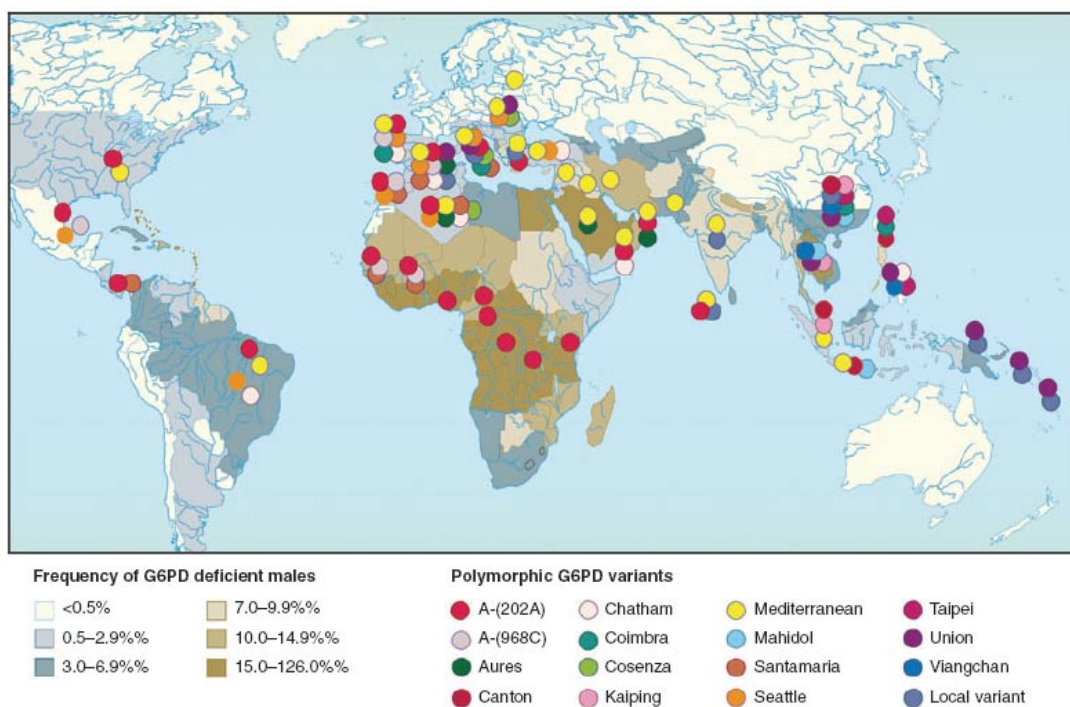
2.2.2.4.2 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เชิงคุณภาพ

เป็นวิธีการตรวจคัดกรอง (screening tests) การทำงานของเอนไซม์อย่างง่ายและรวดเร็ว จัดเป็นการวิเคราะห์เชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) โดยสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น วิธี dichlorophenol-indophenol (DPIP) dye decolorization อาศัยหลักการของการเปลี่ยนสีของ 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) เนื่องจากสารดังกล่าวมีสีฟ้าเมื่ออยู่ในรูป oxidized form และจะไม่มีสีเมื่ออยู่ในรูป reduced form ดังนั้นในการทดสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD วัดได้จาก NADPH ที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้สารดังกล่าวรับอิเล็กตรอนมาจาก NADPH เปลี่ยนสาร DCPIP ในรูป oxidized form เป็น reduced form จึงสามารถวิเคราะห์ผลได้จากการเปลี่ยนแปลงเป็นสารไม่มีสี (65) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบโดย methemoglobin reduction โดยมีหลักการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน (Hb) เป็น

methaemoglobin (MetHb) ด้วย sodium nitrite ซึ่งสังเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของ methylene blue (66) และวิธี fluorescence spot test (64, 67) โดยหลักการทดสอบของวิธี fluorescence spot tests (FST) เป็นวิธีที่อาศัยการเรืองแสง (fluorescence) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของ NADPH หรือ reduced triphosphopyridine nucleotide (TPNH) ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ เอนไซม์ G 6-PD (67) โดยระดับความเข้มของแสง fluorescence แปรผันตรงกับระดับของ NADPH ที่เกิดขึ้น ด้วยเหตุนี้ระดับความเข้มของแสง fluorescence จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับและความสามารถของเอนไซม์ G 6-PD ในชุดทดสอบเอนไซม์ G 6-PD จะประกอบด้วย กลูโคส-6-ฟอสเฟต (G-6-P) TPN สารละลายบัฟเฟอร์ และซาโปนิน (saponin) ที่ใช้ทดสอบกับตัวอย่างเลือด ชนิด whole blood และแปลผลจากการนำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาแล้วหยดลงบนกระดาษกรอง (Whatman paper) แล้วสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของหยดสารละลายที่แห้งบนกระดาษกรอง เช่น หากตัวอย่างมีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะไม่มีการเรืองแสง หากตัวอย่างมีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ปกติจะสามารถมองเห็นการเรืองแสงได้อย่างชัดเจน แต่หากตัวอย่างที่มีค่าการทำงานในระดับปานกลาง (intermediate) จะเห็นการเรืองแสงได้บางส่วนหรือเล็กน้อย เมื่อเทียบกับภาวะปกติ (67)

2.2.2.5 ที่มาของการเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายประเภท ทั้งที่ก่อให้เกิดโทษและประโยชน์ ชนิดที่เป็นโทษ (negative selection) นั้นเป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติของโปรตีน อันนำไปสู่การเกิดโรคหรือพยาธิสภาพต่างๆ ส่วนชนิดที่เป็นประโยชน์ (positive selection) นั้น อาจเกิดขึ้นเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์สำหรับการอยู่รอดต่อไป ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์นี้ก็ดำรงอยู่ต่อไป อีกทั้งสามารถถ่ายทอดต่อไปในรุ่นลูกหลานได้ อาทิเช่น มาลาเรียเป็นสาเหตุที่ทำให้มนุษย์ตายเป็นจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องมีการกลายพันธุ์ หลายชนิดที่ส่งผลต่อหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรีย เช่น ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* (68) โดยสามารถพบในประชากรทั่วโลกได้มากกว่า 500 ล้านคน (44, 69) และมักจะพบในบริเวณแถบเส้นศูนย์สูตรหรือแถบภูมิอากาศร้อนชื้นที่ซึ่งมีมาลาเรียระบาด เพื่อลดจำนวนการติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ดังกล่าว (37, 70) หากพิจารณาจากบริเวณที่มีมาลาเรียระบาด ดังภาพที่ 2.14 จะพบว่าในแถบแอฟริกา (Africa) มีการกลายพันธุ์แบบ *G6PD A-* สูงมาก เพื่อลดความรุนแรงของการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* (48) หรือแม้แต่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่พบการกลายพันธุ์แบบ *G6PD Mahidol* สูง เพื่อลดความรุนแรงจากการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* (12)



ภาพที่ 2.14: แสดงการกระจายตัวของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทั่วโลก โดยแถบสีแสดงความชุกที่พบในแต่ละประเทศ และวงกลมแสดงความหลากหลายของการกลายพันธุ์ของยีน G6PD (G6PD variant) ที่พบในแต่ละประเทศ (69)

2.2.2.6 ยีน G6PD

ยีน G6PD อยู่บนโครโมโซมเพศ X บริเวณปลายข้างยาวของโครโมโซมซึ่งใกล้กับบริเวณเทโลเมียร์ (telomere) (band: Xq28) ยีน G6PD เป็นยีนแรกที่อยู่ลำดับเบสทั้งหมดจากจีโนมของมนุษย์ (71, 72) โดยยีน G6PD มีความยาวประมาณ 18.5 กิโลเบส ประกอบด้วย 13 exon และ 12 intron โดย exon แรกของยีน G6PD เป็นส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสเป็นโปรตีน (5' untranslated region) ประกอบด้วย intron 2 มีความยาวประมาณ 12 กิโลเบส ซึ่งยาวเกือบเทียบเท่าทั้งหมดของยีน G6PD แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานที่แสดงถึงความสำคัญของความยาวของลำดับเบสใน intron 2 นี้ แต่มีข้อสันนิษฐานว่าอาจจะเกี่ยวข้องกันประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนก็เป็นได้ (4, 73) นอกจากนี้ในบริเวณโพรโมเตอร์ (promoter) ของยีน G6PD จะพบเบสกวีนีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) เป็นจำนวนมาก (GC rich) โดยมีความสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่นเดียวกับ promoter ของยีน housekeeping อื่นๆ (74, 75)

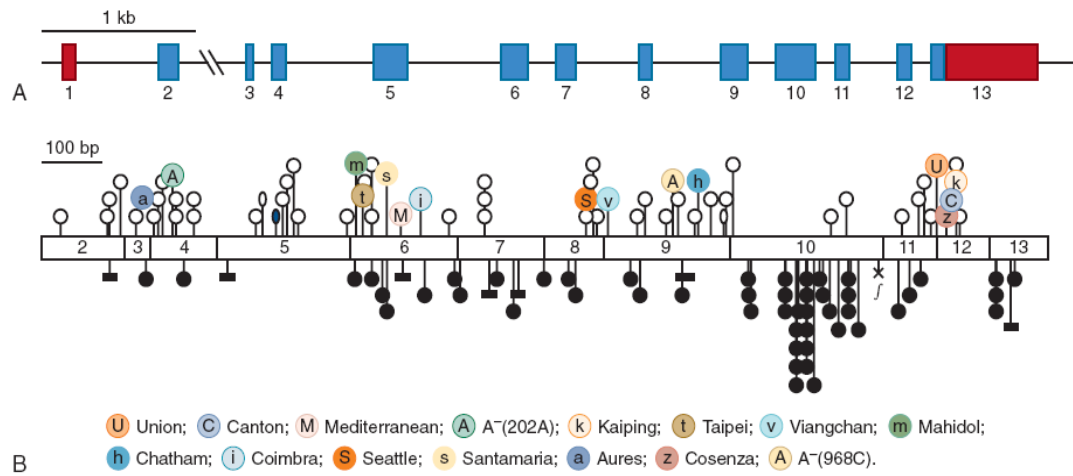
ในอดีตยีน G6PD ใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการศึกษาปรากฏการณ์ inactivation ของโครโมโซม X (X-chromosome inactivation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในเพศ

หญิง เพื่อให้โครโมโซม X มีการแสดงออกเพียงแห่งเดียวเท่านั้น (4, 76) โดยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *G6PD* นั้น มีการถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานทางโครโมโซม X หรือ X-linked recessive ดังนั้นเพศชายเมื่อได้รับการกลายพันธุ์ดังกล่าว จึงมีลักษณะเป็น hemizygous ทำให้การแสดงออกของการกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้ชัดเจนมากกว่าเพศหญิง ในขณะที่เพศหญิงมีกระบวนการ X-chromosome inactivation แบบสุ่ม ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนให้แสดงออกเพียงยีนจากแห่งใดแห่งหนึ่งของโครโมโซมเพศ X สองแห่ง ดังนั้นผู้หญิงที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบพันธุทาง (heterozygous) จึงมีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่หลากหลาย โดยขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์จากสองกลุ่มที่เกิดกระบวนการ X-inactivation ที่ต่างกัน คือ กลุ่มที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ปกติ เนื่องจากเกิดกระบวนการ X-inactivation ของแห่งโครโมโซมที่มีการกลายพันธุ์ และ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ลดลง เนื่องจากเกิดกระบวนการ X-inactivation ของแห่งโครโมโซมที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* (77-79)

2.2.2.7 การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD*

การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ทำให้คุณสมบัติและประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD เปลี่ยนไป โดยอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้าง ความเสถียร หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (80)

เมื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ตามลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ (biochemical characterization) จะพบความหลากหลาย (variant) ได้อย่างน้อย 442 ชนิด โดยมี 229 ชนิดที่กำหนดโดย World Health Organization (WHO) (4) ในขณะที่การศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) จะพบการกลายพันธุ์ประมาณ 140 ชนิด โดย 90 ชนิดได้รวบรวมข้อมูลไว้ดังตารางที่ 2.2 การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นแบบ missense mutation ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และสามารถพบการกลายพันธุ์แบบ deletion ได้บ้างแต่น้อย นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานที่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณ promoter ทั้งนี้ลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะกระจายทั่วทุก exon ของยีน ดังภาพที่ 2.15 (81) แต่จะมีความรุนแรงที่ต่างกันขึ้นกับตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งตำแหน่งที่สำคัญเช่น บริเวณที่จับกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ หรือ บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่พร้อมจะทำงาน (active form) เป็นต้น (4)



ภาพที่ 2.15: แสดงยีน *G6PD* ในมนุษย์ ภาพ A แสดงลักษณะของ exon ภายในยีนทั้งหมดโดยรูปสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงถึงบริเวณที่ไม่ถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีน และรูปสี่เหลี่ยมฟ้าแสดงถึงบริเวณที่ถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ ภาพ B แสดงตำแหน่งและความหลากหลายของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบริเวณ coding region ของยีน *G6PD* ที่ประกอบไปด้วย exon 2 ถึง exon 13 (44)

ตารางที่ 2.2 แสดงความหลากหลายของชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *G6PD* (81)

Variant Name	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution
Gaohe Gaozhou	95 A>G	95G	His32Arg
Honiara	99A>G 1360 C>T	99G 13763T	Met33Ile
Sunderland	105-107 del	105-107 del	105-107 del
Orissa	131 C>G	9988G	Ala44Gly
Aures	143 T>C	10000C	Ile48Thr
Kozukata	159 G>C	10111C	Trp53Cys
Kamogawa	169 C>T	10121T	Arg57Trp
Metaponto	172 G>A	10124A	Asp58Asn
A-- Distrito Federal Matera Castilla Alabama Betica Tepic Ferrara Laghout Kabyle	202G>A 376 A>G	10154A 10877G	Val68Met Asn126Asp
Namoru	208 T>C	10160C	Tyr70His
Murcia	209 A>G	10161G	Tyr70Cys
Swansea	224 T>C	10176C	Leu75Pro
Ube ,Konan	241 C>T	10193T	Arg81Cys

Variant Name	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution
Lagosanto	242 G>A	10194A	Arg81His
Urayasu	281-283 AGA del	10782-10784	94Lys del
Vancouver	317C>G 544C>T 592 C>T	10818G	Ser106Cys Arg182Trp Arg198Cys
Sao Borja	337 G>A	10838A	Asp113Asn
A	376 A>G	10877G	Asn126Asp
Vanua Lava	383 T>C	10884C	Leu128Pro
Chinese-4	392 G>T	10893T	Gly131Val
Cairo	404 A>C	10905C	Asn135Thr
Ilesha	466 G>A	10967A	Glu156Lys
Mahidol	487 G>A	11658A	Gly163Ser
Plymouth	488 G>A	11659A	Gly163Asp
Chinese-3	493 A>G	11664G	Asn165Asp
Naone	497 G>A	11668A	Arg166His
Volendam	514 C>T	11684T	Pro172Ser
Nankang	517 T>C	11687C	Phe173Leu
Shinshu	527 A>G	11698G	Asp176Gly
Chikugo	535 A>T	11706T	Ser179Cys
Malaga	542 A>T	11713T	Asp181Val
Santamaria	542A>T 376 A>G	11713T 10877G	Asp181Val Asn126Asp
Santiago	593 G>C	11764C	Arg198Pro
Tsukui	561-563 del	11732-11734 del	188or189Ser del
Coimbra Shunde	592 C>T	11763T	Arg198Cys

Variant Name	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution
Mediterranean Dallas Birmingham Sassari Cagliari Panama	563 C>T	11734T	Ser188Phe
Sibari	634 A>G	11805G	Met212Val
Minnesota Marion Gastonia LeJeune	637 G>T	11808T	Val213Leu
Harilaou	648 T>G	11996G	Phe216Leu
Mexico City	680 G>A	12028A	Arg227Gln
A--	680G>T 376 A>G	12028A 10877G	Arg227Leu Asn126Asp
Asahikawa	695 G>A	12043A	Cys232Tyr
Durham	713 A>G	12061G	Lys238Arg
Stonybrook	724-729 GGCACT del	12072-12077	242-243Gly&Thr del
Wayne	769 G>C	12117C	Arg257Gly
Wexham	833 C>T	12546T	Ser278Phe
Viangchan Jarnmu	871 G>A	13031A	Val291Met
Cleveland Corum	820 G>A	12533A	Glu274Lys
Chinese-1	835 A>T	12548T	Thr279Ser

Variant Name	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution
Osaka	853 C>T	12566T	Arg285Cys
Montalbano	854 G>A	12567A	Arg285His
West Virginia	910 G>T	13070T	Val303Phe
Seattle Lodi Modena Ferrarall Athens-like	844 G>C	12557C	Asp282His
Seoul	916 G>A	13076A	Gly306Ser
Kalyan Kerala	949 G>A	13109A	Glu317Lys
A-- Betica Selma Guantanamo	968T>C 376A>G	13128C 10877G	Leu323Pro Asn126Asp
Nara	953-976 del	13113-13136 del	319-326 del
Chatham	1003 G>A	13163A	Ala335Thr
Fushan	1004C>A	1 13164A	Ala335Asp
Chinese-5	1024 C>T	13184T	Leu342Phe
Partenope	1052G>T	13351T	Gly351Val
Ierapetra	1057 C>T	13356T	Pro353Ser
Loma Linda	1089 C>A	13388A	Asn363Lys
Calvo Mackenna	1138 A>G	13437G	Ile380Val
Riley	1139 T>C	13438C	Ile380Thr
Olomouc	1141 T>C	13440C	Phe381Leu
Tomah	1153 T>C	13452C	Cys385Arg

Variant Name	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution
Iowa Walter Reed Iowa City Springfield	1156 A>G	13455G	Lys386Glu
Guadalajara	1159 C>T	13458T	Arg387Cys
Mt. Sinai	1159C>T 376 A>G	13458T 10877G	Arg387Cys Asn126Asp
Beverly Hills Genova Worcester	1160 G>A	13459A	Arg387His
Praba	1166 A>G	13465G	Glu389Gly
Wisconsin	1177 C>G	13476G	Arg393Gly
Nashville Anaheim Calgary Portici	1178 G>A	13447A	Arg393His
Alhambra	1180 G>C	13479C	Val394Leu
Japan Shinagawa	1229 G>A	13529A	Gly410Asp
Bari	1187 C>T	13486T	Pro396Leu
Puerto Limon	1192 G>A	13491A	Glu398Lys
Anadia	1193 A>G	13492G	Glu398Gly
Clinic	1215 G>A	13514A	Met405Ile
Riverside	1228 G>T	13527T	Gly410Cys
Tokyo	1246 G>A	13545A	Glu416Lys
Georgia	1284 C>A	13560A	Tyr428End

Variant Name	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution
Vansdorf	3' intron 10 splice site del	13689-13690 del	N/A
Pawnee	1316 G>C	13719C	Arg439Pro
Telti Kobe	1318 C>T	13721T	Leu440Phe
Santiago de Cuba	1339 G>A	13742A	Gly447Arg
S. Antioco	1342 A>G	13745G	Ser448Gly
Cassano	1347 G>C	13750C	Gln449His
Union Maewo	1360 C>T	13763T	Arg454Cys
Andalus	1361 G>A	13764A	Arg454His
Cosenza	1376 G>C	13884C	Arg459Pro
Kamiube	1387 C>T	13895T	Arg463Cys
Fukaya	1462 G>A	14067A	Gly488Ser
Campinas	1463 G>T	14068T	Gly488Val
Canton Taiwan-Hakka Gifu-like Agrigento-like	1376 G>T	13884T	Arg459Leu
Kaiping Anant Dhon Petrich Sapporo	1388 G>A	13896A	Arg463His

N/A คือ ไม่มีข้อมูล

การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* มีความแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มชาติพันธุ์ ภาษา และถิ่นฐาน อาทิเช่น พบการกลายพันธุ์ *G6PD A-* ในคนอเมริกันผิวดำ ร้อยละ 20 ในขณะที่การกลายพันธุ์ชนิด *G6PD A+* พบในคนแอฟริกันร้อยละ 20-30 (82, 83) สำหรับการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mediterranean* ร้อยละ 70 ในคนยิวกลุ่ม *Kurdish Jews* และยังพบได้บ่อยในประชากรอินเดีย ร้อยละ 60.4 อีกด้วย (84) ส่วนในแถบเอเชีย ยกตัวอย่างเช่น การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบได้มากในประชากรได้หวั่นคือการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Canton* พบมากถึงร้อยละ 50 ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในประชากรชาวจีนมีสองชนิดคือ *G6PD Kaiping* และ *G6PD canton* ที่คิดเป็นร้อยละ 33 และ 29 ตามลำดับ (83, 85) นอกจากนี้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มี 2 ชนิด คือ *G6PD Mahidol* ในชาวพม่า (6) และมอญ (7) และ *G6PD Viangchan* ในชาวไทย (8) เขมร (6, 9, 10) และลาว (11)

2.2.2.7.1 Afro - American variants

ภาวะพร่องเอนไซม์ *G 6-DP* ในคนแอฟริกัน (African) หรือการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD A-* เป็นภาวะพร่องชนิดรุนแรง มีค่าการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงร้อยละ 10-15 ของค่าการทำงานในคนปกติหรือ *G6PD B* โดยสามารถพบได้ในกลุ่ม Afro-America ถึงร้อยละ 11 (82) (ดังภาพที่ 2.14) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์อีกชนิดมากในชาวแอฟริกันซึ่งมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ ถูกกำหนดเป็นการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD A+* โดยพบร้อยละ 20-30 ในคนแอฟริกัน ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดมีตำแหน่งการกลายพันธุ์เหมือนกันในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 376 โดยเปลี่ยนจากเบส A เป็น G ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนจาก aspartic acid เป็น asparagines แต่การกลายพันธุ์ชนิด *G6PD A-* มีตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 202 โดยเปลี่ยนจากเบส G เป็น A หรืออาจจะพบที่ตำแหน่ง 680 โดยเปลี่ยนจากเบส G เป็น T จากการค้นพบดังกล่าวจึงมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมว่า *G6PD A+* น่าจะเป็นอัลลีลต้นกำเนิดของ *G6PD A-* โดยมีการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD A-* เกิดขึ้นตามมาบนอัลลีล *G6PD A+* นอกจากนี้ยังสามารถพบการกลายพันธุ์แบบ *G6PD A-* ในเม็กซิโก (mexico) และในประเทศแถบยุโรปตอนใต้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากชาวแอฟริกันบางส่วนได้อพยพมาบริเวณทางตอนใต้ของยุโรป (86)

2.2.2.7.2 Mediterranean variants

การกลายพันธุ์ที่พบมากในบริเวณเมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean) ถูกกำหนดในชื่อ G6PD Mediterranean โดยการกลายพันธุ์นี้เกิดจากการเปลี่ยนเบสในนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 563 เปลี่ยนจากเบส C เป็น T ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 188 จาก serine เป็น phenylalanine การกลายพันธุ์ชนิดนี้พบครั้งแรกจากการศึกษาในประชากร Fuscaldو ทางตอนใต้ของประเทศอิตาลี (87) ในขณะเดียวกันยังสามารถพบการกลายพันธุ์นี้ในกลุ่มประชากรที่อยู่ในบริเวณแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง (Middle East) และในอินเดีย (88) ต่อมาพบว่าการกลายพันธุ์แบบ G6PD Mediterranean มี single nucleotide polymorphism (SNP) ที่เปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1311 โดยเปลี่ยนแปลงจากเบส C เป็น T แต่การกลายพันธุ์นี้ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 437 (silent mutation) (89) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าผู้ชายที่มีการกลายพันธุ์แบบ G6PD Mediterranean ทุกคนในแถบเมดิเตอร์เรเนียนและตะวันออกกลาง จะมี SNP 1311C → T (89) ดังนั้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนมากขึ้นในการกล่าวถึงการกลายพันธุ์ชนิดนี้จึงกำหนดว่า ถ้าพบการกลายพันธุ์เพียงอัลลีลเดียวที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 563 C → T ถือว่าเป็นการกลายพันธุ์ G6PD Mediterranean ชนิดที่ 1 (Med1) และถ้าพบการกลายพันธุ์สองอัลลีลที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 563 C → T และ 1311 C → T ไปพร้อมๆ กันจะถือว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ 2 (Med2) และจากการศึกษาในประชากรส่วนใหญ่มักจะพบการกลายพันธุ์แบบ Med2 ในขณะที่การกลายพันธุ์แบบ Med1 มักพบในแถบอิตาลีและอินเดีย (90, 91) นอกจากนี้ยังพบ G6PD Seattle ในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยเป็นการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 844 จากเบส G เป็น C ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 282 จาก aspartic acid เป็น histidine (51)

2.2.2.7.3 Asian variants

ประชากรแถบเอเชียมีความหลากหลายทางชาติพันธุ์ ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมที่พบมีความหลากหลายเช่นกัน ตัวอย่างการกลายพันธุ์ที่พบในเอเชีย อาทิเช่น G6PD Canton ซึ่งพบมากในกลุ่มประชากรเชื้อสายจีนที่อาศัยอยู่ในไต้หวัน จีน และมาเลเซีย (92) ส่วนการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี 2 ชนิด คือ การกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan เป็นการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 871 จากเบส G เป็น A ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 291 จาก valine เป็น Methionine โดยการกลายพันธุ์ชนิดนี้พบมากในประชากรชาวไทย (8) ลาว (11) และเขมร (6, 9, 10) ในขณะที่การกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol เปลี่ยนเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 487 จากเบส G เป็น A ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนที่

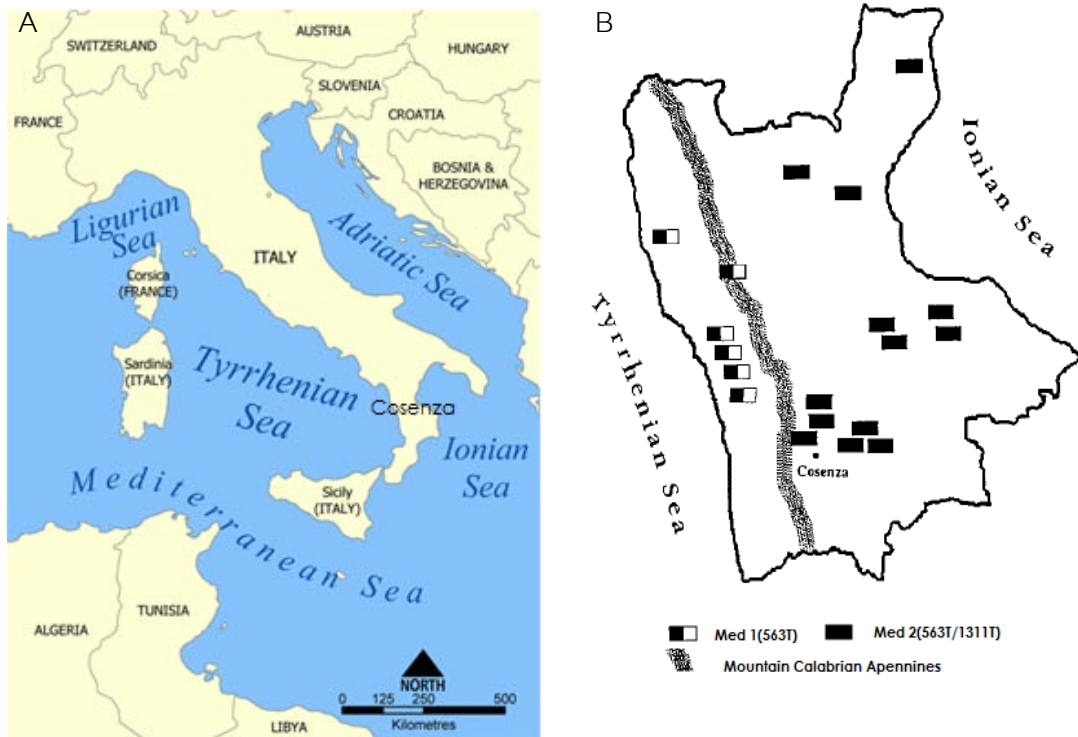
ตำแหน่ง 163 จาก glycine เป็น serine ซึ่งพบมากในกลุ่มประชากรมอญและพม่า (6, 7) ดังภาพที่ 2.14 ขณะที่ชาวฟิลิปปินส์มักจะพบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Union โดยการกลายพันธุ์นี้ยังพบได้ในกลุ่มประชากรเชื้อชาติอื่นๆเช่น สเปน อิตาลี (93) และหมู่เกาะวานูอาตูที่ตั้งอยู่ในแถบมหาสมุทรแปซิฟิกตอนใต้ ทางตะวันออกของประเทศออสเตรเลีย (51) จากการศึกษาพบว่า การกลายพันธุ์ชนิดนี้พบได้ทั่วไป เนื่องจากอิทธิพลของการอพยพของกลุ่มประชากร (population flow) ดังนั้นในการศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD นอกจากจะศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ร่วมด้วยแล้ว ยังมีการศึกษาภาวะพหุสัณฐาน เพื่อสืบค้นลักษณะแฮปโลไทป์ (haplotypes) ที่เหมือนหรือต่างกันในแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการอธิบายความสัมพันธ์ของชาติพันธุ์ โดยตัวอย่างลักษณะ haplotypes ที่ได้มีการศึกษาในแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้แสดงดังตารางที่ 2.3 โดย SNPs ที่อยู่ในตารางสีเทาแสดงถึงลักษณะ haplotype ที่จะพบไปพร้อมๆกับการกลายพันธุ์นั้นๆ (94)

ตารางที่ 2.3 แสดง haplotypes ในแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* (94)

HAPLOTYPE	RS1050828	RS1050829	RS137852328	RS2230037	RS5030868	RS76723693
G6PD haploytpe A- 202A/376G	T	C	C	G	G	A
G6PD haploytpe A- 680T/376G	C	C	A	G	G	A
G6PD haploytpe A- 968C/376G	C	C	C	G	G	G
G6PD haploytpe B (wildtype)	C	T	C	G	G	A
G6PD haploytpe Mediterranean	C	T	C	A	A	A

2.3 ความสัมพันธ์ของยีน *G6PD* กับภาวะตาบอดสี

จากการศึกษาของ Filosa S. (3) ได้ศึกษารูปแบบ haplotypes ในระยะตั้งแต่ยีน *coagulation factor VIIIc (F8C)* ยีน *G6PD* จนถึงยีน *OPN1LW/OPN1MW* โดยศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในกลุ่มประชากรทางตอนใต้ของประเทศอิตาลีแถบชายฝั่งทะเล Tyrreเนียน (Tyrreเนียน) เป็นหลัก (ดังภาพที่ 2.16) พบว่าชาวเมดิเตอร์เรเนียนที่อาศัยอยู่ฝั่งทะเล Tyrreเนียน ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mediterranean (Med1)* ทุกคนจะมีภาวะตาบอดสีเขียว (deuteranopia) ร่วมด้วย ขณะที่ชาวเมดิเตอร์เรเนียนที่มีต้นกำเนิดมาจากชนเผ่าซาร์ดิเนีย (Sardinia) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mediterranean (Med2)* จะไม่พบภาวะตาบอดสีเขียว จากการศึกษ haplotypes ในกลุ่มประชากรชายฝั่งทะเล Tyrreเนียน แสดงให้เห็นว่า ภาวะตาบอดสีเขียวที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1MW* นั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ (linkage disequilibrium) กับการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด Mediterranean type 1 (3) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางฟีโนไทป์ (phenotype) ระหว่างภาวะตาบอดสีกับภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกลุ่มประชากรบังคลาเทศในประเทศอินเดีย โดยผลการวิจัยพบว่าเด็กที่มีภาวะตาบอดสีเขียว-แดงมักจะพบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ร่วมด้วย (95)



รูปที่ 2.16: ภาพ A แสดงแผนที่แสดงบริเวณแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ภาพ B แสดงแผนที่การกระจายตัวของการกลายพันธุ์แบบ G6PD Mediterranean ที่พบใน Cosenza ซึ่งแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ Med1 และ Med2 โดยการกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดพบในบริเวณที่แตกต่างกันโดย Med1 จะพบในบริเวณที่ติดชายฝั่งทะเลดิเรเนียน ส่วน Med2 พบบริเวณแผ่นดินหลังเทือกเขา Calabrian Apennines (3)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกกลุ่มประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

3.1.1 กลุ่มประชากร

กลุ่มประชากรเป้าหมายเป็นชาวกะเหรี่ยง กลุ่มปากะญอ ที่อาศัยอยู่ในหมู่ที่ 6 หมู่บ้านแม่सान ตำบลแม่สำ อำเภอสรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย เนื่องจากงานวิจัยสนใจการกลายพันธุ์แบบมิตอดเป็นหลัก จึงเลือกกลุ่มชาวกะเหรี่ยงที่น่าจะพบการกลายพันธุ์ G6PD Mahidol มาก เช่นเดียวกับชาวพม่า และมอญ งานวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างในช่วงวันที่ 12 – 15 ตุลาคม พ.ศ.2553 ซึ่งเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 230 คน เป็นชาย 106 คนและหญิงอีก 124 คน โดยมีเกณฑ์การเลือกเข้าดังนี้ เป็นชาวกะเหรี่ยงที่มีอายุ 5 ปีขึ้นไป มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง และยินยอมเข้าร่วมโครงการ โดยสอบถามข้อมูลและประวัติครอบครัวได้แก่ เพศ อายุ ที่อยู่ เชื้อชาติ และเชื้อสายวงศ์ตระกูล เพื่อเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ผลทางพันธุศาสตร์ โดยการสัมภาษณ์ได้รับความร่วมมือจากอาสาสมัครหมู่บ้าน (อสม.) ในการเป็นล่ามช่วยสัมภาษณ์อาสาสมัครที่ไม่สามารถสื่อสารภาษาไทยได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำความเข้าใจกับล่ามเป็นอย่างดีก่อนที่จะทำการสัมภาษณ์อาสาสมัคร และมีพยานรับรู้เพื่อยืนยันความถูกต้องของข้อมูลที่ได้รับและข้อมูลที่อาสาสมัครได้รับ ทั้งนี้ประวัติส่วนตัวของอาสาสมัครได้รับการปกปิด โดยใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของอาสาสมัคร เปิดเผยข้อมูลเฉพาะส่วนที่วิเคราะห์แล้ว และจะไม่แสดงผลเป็นรายบุคคล งานวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ COA No. 697/2011 IRB No. 402/54

3.1.2 ขนาดกลุ่มตัวอย่าง

ในการวิจัยนี้ข้อมูลที่แสดงเป็นการประมาณร้อยละ ดังนั้นสูตรที่ใช้ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง คือ

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

โดยที่ $N = 500$ คน

$Z = 1.96$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

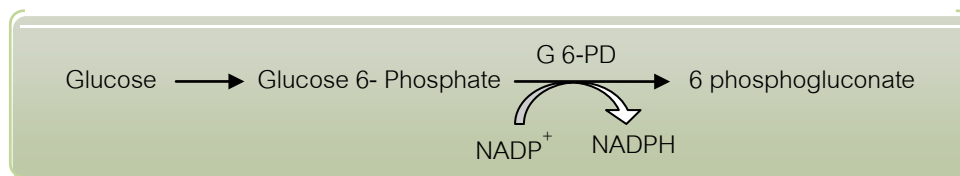
$E =$ ค่าคลาดเคลื่อน = 0.05

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดที่หลอดเลือดดำบริเวณต้นแขน ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด acid citrate dextrose (ACD) จำนวน 3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจวัดค่าการทำงานของ G 6-PD และหลอด ethylenediaminetetraacetate (EDTA) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

3.3 การศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD โดยใช้เทคนิค fluorescence spot test (FST; R&D DIAGNOSTICS LTD) (67) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยนอกพื้นที่ เนื่องจากเป็นวิธีการที่เร็วและสะดวก แต่เป็นการวินิจฉัยเชิงคุณภาพโดยอาศัยการเรืองแสง fluorescence ของ NADPH ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV; 365 nm)

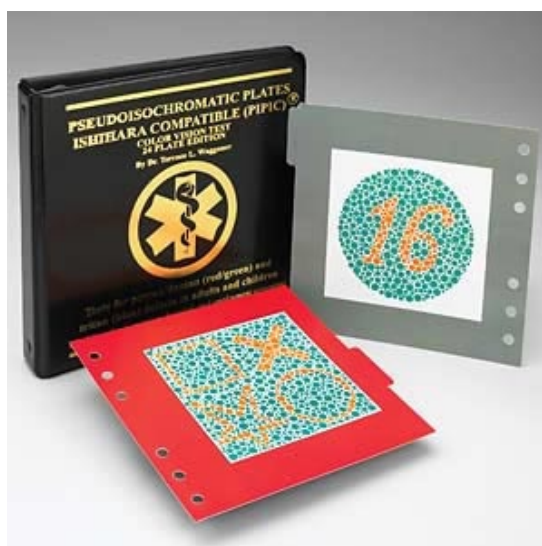


โดยนำตัวอย่างเลือดทำปฏิกิริยากับสารละลาย (G 6-P, NADP^+ , กลูตาไทโอนในรูปแบบออกซิไดซ์ (GSSG), saponin, Tris (hydroxymethyl) –aminomethane) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะหยดลงในกระดาษกรอง ทิ้งให้กระดาษกรองแห้ง แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต หากตัวอย่างมีการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD เป็นปกติ (normal) จะสามารถมองเห็นการเรืองแสงได้ชัดเจน ส่วนตัวอย่างในกลุ่ม intermediate พบการเรืองแสงได้เล็กน้อยหรือเอนไซม์ G 6-PD สามารถทำงานได้บ้าง และตัวอย่างที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (deficiency) จะไม่พบการเรืองแสงได้

3.4 การศึกษาภาวะตาบอดสีแดง-เขียว

การทดสอบภาวะตาบอดสีแดง – เขียวในงานวิจัยนี้ อาศัยวิธี Ishihara test ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและง่ายต่อการวินิจฉัยนอกพื้นที่ เพราะเป็นวิธีการที่เร็วในการคัดแยกภาวะตาบอดสีกับสายตปกติ และสามารถจำแนกภาวะตาบอดสีแดง – เขียว และตาบอดสีน้ำเงิน – เหลือง โดยหลักการของ Ishihara test จะอาศัยการจำแนกสีของแผ่นตัวเลขที่แสดงด้วยจุดหลายสีคละกันอยู่ ถ้าหากเป็นภาวะตาบอดสีจะไม่สามารถอ่านตัวเลขบนแผ่นทดสอบได้ ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้ Ishihara Compatible Pseudoisochromatic Plate (PIPIC) ของ Dr. Terrace L Waggoner ดังภาพที่ 3.1 ที่ประกอบด้วยชุดตัวเลข และชุดรูปภาพเรขาคณิตอย่างง่าย อีกทั้งทางผู้วิจัย

เลือกใช้ร่วมกัน เพื่อเป็นตัวกลางในการสื่อสารให้อาสาสมัครลากตามภาพที่เห็น รวมทั้งใช้ล่ามช่วย เพื่อแก้ปัญหาการสื่อสารที่ผิดพลาด และปัญหาการไม่รู้หนังสือ เนื่องจากการตรวจสอบในกลุ่มประชากรที่เป็นชาวกะเหรี่ยง ที่อาจจะเกิดความผิดพลาดหรือความเข้าใจผิดในการสื่อสารได้



ภาพที่ 3.1: แสดงชุดทดสอบภาวะตาบอดสีแดง-เขียว Ishihara Compatible Pseudoisochromatic Plate (PIPIC) ของ Dr. Terrace L Waggoner

3.5 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

การสกัด DNA โดยวิธี phenol-chloroform extraction (12) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บ -20 องศาเซลเซียส มาปั่นล้างเพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดงด้วยสารละลาย lysis buffer (0.32 M sucrose (USB Corporation), 10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich Co. LLC) pH7.5, 5 mM MgCl₂ (Bio Basic Inc.), 1% triton X-100 (Sigma-Aldrich Co. LLC.)) เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 2,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำเพื่อล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงออก

2. ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตกเพื่อแยก DNA โดยใช้ Proteanase K (AMRESCO) ใน SE buffer (0.024 M EDTA (AMRESCO) pH 8.0 และ 0.075 M NaCl (USB Corporation)) บ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน

3. แยกโปรตีนออกจาก DNA ด้วย Phenol: Chloroform: isopropanol (Merck) ในอัตราส่วน 25: 24: 1 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที – 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,500 rpm เก็บสารละลายส่วนบนมาตกตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol และละลาย

ตะกอน DNA ด้วย 1xTE-4 buffer (10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich Co. LLC) pH 8.0 , 0.1 mM EDTA(AMRESCO) pH 8.0)

4. วัดความเข้มข้น DNA ด้วยเครื่อง Nano Drop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc) โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 ul วัดการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และจัดเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วปรับความเข้มข้นด้วย 1xTE-4 buffer

3.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *G6PD*, *OPN1LW/OPN1MW* และ *CXorf2/TEX28*

3.6.1 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Mahidol*

ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Mahidol* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) – restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้ primer ตามรายงานก่อนหน้า⁷ (7)

- Forward primer คือ 5'-GCGTCTGAATGATGCAGCTCTGAT-3'

- Reverse primer คือ 5'-CTCCACGATGATGCGGTTCAAGC-3'

ปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน DNA เป็นดังนี้

- Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที

: Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที

: Annealing ใช้อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 45 วินาที

: Extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที

} 35 รอบ

- Post-extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 15 นาที

การกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* (487 G>A) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ที่มี sequence ตัดจำเพาะคือ A[^]AGCTT (12) ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง (487 G>A) โดย product ที่ได้มีดังนี้

- ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ *G6PD Mahidol* (487 G>A) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาด 82 bp และ 22 bp

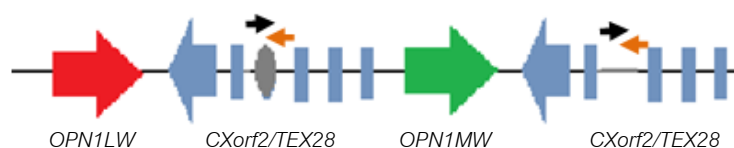
- ตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ *G6PD Mahidol* (487 G>A) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาด 104 bp

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ในการแยกชิ้นส่วน DNA ที่ได้ โดยใช้ 8% Polyacrylamide gel electrophoresis (29% Acrylamide+ 1% N,N'methylenebisacrylamide ; Bio-Rad Laboratories, Inc.), 5X TBE (Bio-Rad

Laboratories, Inc.), 10% Ammonium persulfate(USB Corporation), TEMED (Bio-Rad Laboratories, Inc.) และ น้ำกลั่น) จากนั้นย้อมเจลดด้วย Ethidium bromide (EtBr ; Bio-Rad Laboratories, Inc.) ก่อนที่จะนำไปถ่ายรูปโดยเครื่อง Gel Documentation (Gel Doc: Bio-Rad Laboratories, Inc.)

3.6.2 การศึกษาภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* ด้วยเทคนิค Gap-PCR

ทำการศึกษาดังวิธี Long-length PCR โดยออกแบบ primer ให้ครอบคลุมช่วง 697 bp deletion ในยีน *CXorf2/TEX28* (1) ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม Primer Premier 5 โดยอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI)



ภาพที่ 3.2: แสดงรูปแบบในการออกแบบ primer โดยออกแบบ forward primer (ลูกศรสีดำ) และ reverse primer (ลูกศรสีส้ม) ให้ครอบคลุมช่วง 697 bp deletion (วงรีสีเทา) ที่ตั้งอยู่บนบริเวณ intron3 ของยีน *CXorf2/TEX28* (ลูกศรสีฟ้าและสีเหลี่ยมสีฟ้า โดยจำนวนแสดงถึง exon) ที่เรียงตัวต่อยกยีน *OPN1LW/OPN1MW* (ลูกศรสีแดงและเขียวตามลำดับ)

- Forward primer คือ 5'-CTCCAAGCCTCGTCTGAAAG-3'
- Reverse primer คือ 5'- CTGGGTGATAGAGGACAGAG-3'

ปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน DNA เป็นดังนี้

- Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที
 - : Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที
 - : Annealing ใช้อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30 วินาที
 - : Extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที
- } 35 รอบ
- Post-extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที

PCR product ขนาด 1554 bp สำหรับ *TEX28* ที่ไม่พบ 697 bp deletion และ ขนาด 886 bp สำหรับ *TEX28* ที่พบ 697 bp deletion แต่ความยาวนี้ยังขึ้นอยู่กับ CT rich ใน

sequence ซึ่งมีความยาวประมาณ 27 bp ใน *fTEX* ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้ Gel electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose (Research Organics) gel จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide ก่อนที่จะนำไปถ่ายภาพโดยเครื่อง Gel Documentation (Gel Doc ; Bio-Rad Laboratories, Inc.)

3.6.3 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW*

ในการศึกษาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีนดังกล่าวที่ทำให้เกิดภาวะตาบอดสีแดง-เขียว ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้วิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยวิธี sequencing ทั้ง 6 exon ของทั้งสองยีน ส่วน promoter และบริเวณ LCR อีกด้วย ซึ่ง primer ที่ใช้ในการ amplify ชิ้นส่วนดังกล่าวอ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (29,97) แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ primer ที่ใช้ในการ amplify ชิ้นส่วนต่างๆในยีน *OPN1LW* และยีน *OPN1MW*

POSITION	FORWARD PRIMER 5' → 3'	REVERSE PRIMER 5' → 3'	PCR PRODUCT
LCR	TTAGGAGTAGTCGCATTAGAGA	CAGAGGAGGAGTGGGGTGTC	661
PMR	GCCTCTCA CCTTAAAAGCT	GCGGACGC AGG ACAGTAGAA	258
PMG	GCCTCT TCACCTAAAAGCT	ACCTCCGCCTCCCAGATTCAAG	205
exon 1	CTTTCCATAGCCATGGCCCAG	TCTGGTGGAGTTGCTGTTGGT	123
exon 2	CCTCAGGCCCTTCGAAGG	CCACACAGGGAGACGGTGT	304
exon 3	CCCTCATCTGTCTGCTCTCC	CCTTACCTGCTCCAACAAA	201
exon 4	AGGAGTCTCAGTGGACTCAT	ACAAACCCACCCGAGTTAG	340
exon 5	TCC AACCCCGACTCACTATC	ACGGTATTTTGATGTGGATCTGCT	314
exon 6	CCCTGCTCTGCTCAATAACG	GCGATACCGAGGACACAGAT	139

** LCR: Locus control regions, PMR: promoter red opsin, PMG: promoter green opsin.

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.7.1 การคำนวณความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวกะเหรี่ยงทั้งชายและหญิง

$$\text{ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ } G 6 - PD = \frac{a}{a + b}$$

; a คือ จำนวนประชากรที่พบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในช่วงเวลานั้นๆ

; b คือ จำนวนประชากรที่ไม่พบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในช่วงเวลานั้นๆ

3.7.2 การคำนวณความชุกของภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในชาวกะเหรี่ยงทั้งชายและหญิง

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

; a คือ จำนวนประชากรที่พบภาวะตาบอดสีในช่วงเวลานั้นๆ

; b คือ จำนวนประชากรที่ไม่พบภาวะตาบอดสีในช่วงเวลานั้นๆ

3.7.3 การวิเคราะห์พงศาวรี (Pedigree) ของอาสาสมัครทั้งหมด

เนื่องจากการศึกษาตามทฤษฎีของ Gregor Mendel ที่ทำให้ทราบว่าลักษณะทางพันธุกรรมมีการถ่ายทอดลักษณะจากพ่อแม่สู่ลูก โดยลักษณะการถ่ายทอดจะเป็นอิสระต่อกันและถ่ายทอดควบคู่กันไป ดังนั้นจึงมีการสร้าง pedigree ขึ้นมาเพื่อแสดงการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่สู่รุ่นลูกหลานต่อไป ในงานวิจัยครั้งนี้ยังได้คัดเลือกตัวอย่างที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (unrelated individual) โดยเลือกให้ได้จำนวนมากที่สุด (maximum unrelated samples) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ linkage disequilibrium ต่อไป (98)

3.7.4 การตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล genotyping ตามกฎ Hardy - Weinberg Equilibrium

Hardy - Weinberg Equilibrium (HWE) เป็นหลักการที่ใช้สถิติในการอธิบายถึงความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมในกลุ่มประชากร โดยกฎของ Hardy - Weinberg กล่าวไว้ว่า “ในประชากรของพืชผสมข้ามที่เป็น diploid species ที่ประกอบต้นพืชเป็นจำนวนมาก เมื่อปล่อยให้มีการผสมกันแบบสุ่ม (random mating) โดยไม่มีการคัดเลือกพันธุ์ (no selection) ไม่มีการย้ายที่อยู่ (no migration) และไม่มีการกลายพันธุ์ (no mutation) เกิดขึ้นแล้ว อัตราส่วนของยีนแต่ละคู่ที่มีอยู่ 2 อัลลีล (allele) และอัตราส่วนของจีโนไทป์ของยีนคู่ดังกล่าว จะคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากชั่วหนึ่งไปสู่อีกชั่วหนึ่ง ประชากรที่อัตราส่วนของยีนและจีโนไทป์คงที่จากชั่วหนึ่งไปสู่อีกชั่วหนึ่งนั้น จัดเป็นประชากรที่อยู่ในสภาพสมดุล (Hardy Weinberg equilibrium) ถ้า

ประชากรเดิมไม่อยู่ในสภาพสมดุล หากปล่อยให้ผสมข้ามแบบสุ่มเพียง 1 รุ่น ประชากรดังกล่าวก็จะเข้าสู่สภาพสมดุลทันที” (98) โดยสมการ HWE เขียนได้ดังนี้

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = 1$$

การประยุกต์ใช้ HWE สามารถนำมาอธิบายถึงวิวัฒนาการในกลุ่มประชากร และสามารถคิดหาความถี่อัลลีลในกลุ่มประชากรได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ คำนวณหาค่า p -value จาก chi-squared test (χ^2) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel

3.7.5 การวิเคราะห์ความถี่อัลลีล (allele frequencies) ในแต่ละการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *G6PD* และ *CXorf2/TEX28* โดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel

ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร เพื่อที่จะอธิบายถึงโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรในช่วงเวลาหนึ่ง มักจะอธิบายได้ด้วย การวิเคราะห์ความถี่อัลลีล หรือความถี่ยีน โดยความถี่อัลลีลเป็นส่วนหนึ่งของอัลลีลนั้นในจำนวนทั้งหมดของยีนตำแหน่งหนึ่งในประชากร โดยคิดได้จากความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) (98)

3.7.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง *G6PD* Mahidol กับภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28*

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสองอัลลีล อาศัยการคำนวณ Linkage disequilibrium (LD) จากข้อมูลจีโนไทป์ของ unrelated sample โดยใช้โปรแกรม CubeX ซึ่งโปรแกรมจะวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการรวมตัวของอัลลีลสองอัลลีลในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยสามารถวิเคราะห์เป็นค่าความถี่ D' r^2 และ χ^2 ทำให้สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ linkage disequilibrium ระหว่างอัลลีลสองตำแหน่งที่เกิดความเบี่ยงเบนไปจากกฎของ Hardy-Weinberg equilibrium (99) การวิเคราะห์ค่าทางสถิติสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า D' โดยถ้า $D' \neq 0$ แสดงว่าสองอัลลีลนั้นมีความสัมพันธ์กันเป็นแบบ LD ในขณะที่ค่า $D' = 0$ แสดงให้เห็นว่าสองอัลลีลนั้นมีความสัมพันธ์กันแบบ linkage equilibrium (98)

การพบ Linkage disequilibrium นั้นสำคัญต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์การแพทย์ โดยมีอิทธิพลต่อการทำแผนที่ยีนและความสัมพันธ์ระหว่างสองยีน (100) โดยผลจากการที่เกิด LD ระหว่างสองยีนจะช่วยอธิบายถึงการกลายพันธุ์และ recombination ที่เกิดขึ้นในอดีต นอกจากนี้ยังรวมถึงปัจจัยอื่นๆ ที่เกิดขึ้น เช่น การผกผันทางพันธุกรรม (genetic drift) การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพและการเคลื่อนย้ายประชากร โครงสร้างประชากร และอายุของภาวะพหุสัญญาณนั้นๆ ที่เกิดขึ้นได้ (101,102)

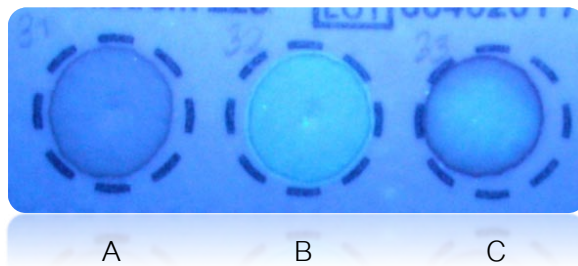
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในประชากรกะเหรี่ยง

4.1.1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

จากการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ด้วยเทคนิค Fluorescent spot test (FST) (ดังภาพที่ 4.1) ในประชากรกะเหรี่ยงทั้งหมด 230 คน เป็นชาย 106 คน และหญิง 124 คน พบภาวะพร่องเอนไซม์ในเพศชายจำนวน 15 คน คิดเป็นร้อยละ 14.2 และในเพศหญิง 5 คน คิดเป็นร้อยละ 4 นอกจากนี้พบผู้ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ในระดับปานกลาง (intermediate) ในเพศหญิงจำนวน 19 คน คิดเป็นร้อยละ 15.3 และในเพศชาย 8 คน คิดเป็นร้อยละ 7.5 ดังตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1: แสดงผลการทดลองในการศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ด้วยวิธี Fluorescent spot test ภาพ A เป็นตัวอย่างที่จัดในกลุ่มเอนไซม์ทำงานระดับปกติ ภาพ B เป็นตัวอย่างที่จัดในกลุ่มเอนไซม์ทำงานระดับปานกลาง ภาพ C เป็นตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มพร่องการทำงานของเอนไซม์

จากการสอบถามความสัมพันธ์ระดับเครือญาติระหว่างอาสาสมัครแต่ละคน จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 230 คน แล้วนำมาวิเคราะห์พงศาวรี (pedigree) พบกลุ่มประชากรที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (unrelated individual) จำนวน 80 คน เป็นหญิง 44 คน และชาย 36 คน และผลการตรวจการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD เป็นเพศหญิง 1 คน คิดเป็นร้อยละ 2.3 และเป็นเพศชาย 9 คน คิดเป็นร้อยละ 25 นอกจากนี้พบผู้ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ในระดับปานกลาง (intermediate) ในเพศหญิง จำนวน 6 คน คิดเป็นร้อยละ 13.6 และในเพศชาย จำนวน 3 คน คิดเป็นร้อยละ 8.3 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในประชากรกะเหรี่ยง

ตัวอย่าง	เพศ	จำนวน (N)	สถานะของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD		
			พร่อง (%)	ปานกลาง (%)	ปกติ (%)
ประชากรทั้งหมด	ชาย	106	15 (14.2)	8 (7.5)	83 (78.3)
	หญิง	124	5 (4.0)	19 (15.3)	100 (80.7)
	รวม	230	20 (8.7)	27 (11.7)	183 (79.6)
Unrelated individuals	ชาย	36	9 (25.0)	3 (8.3)	24 (66.7)
	หญิง	44	1 (2.3)	6 (13.6)	37 (84.1)
	รวม	80	10 (12.5)	9 (11.2)	61 (76.3)

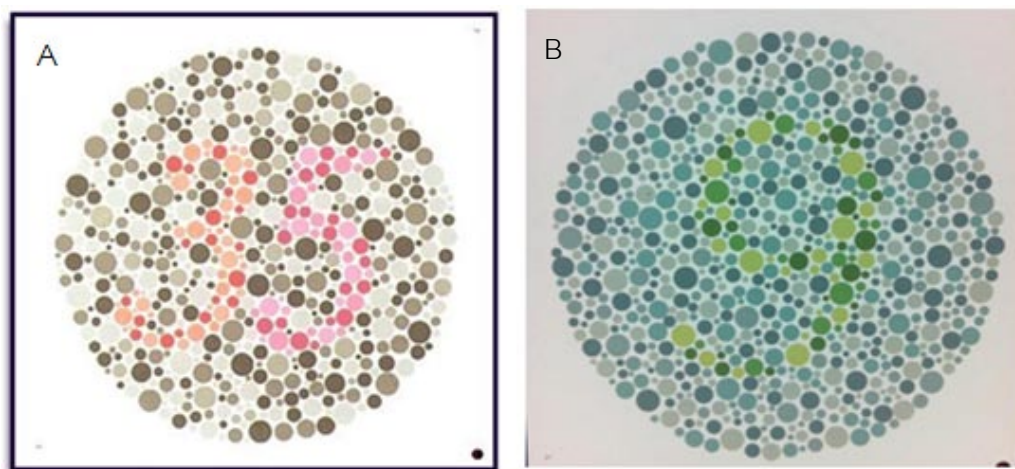
4.1.2 ความชุกของภาวะตาบอดสีแดง-เขียว

จากการตรวจภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในประชากรกะเหรี่ยง ด้วยชุดทดสอบ Ishihara Compatible Pseudoisochromatic Plate (PIPIC) ของ Dr. Terrace L Waggoner โดยหลักการทดสอบที่จะแยกชนิดของภาวะตาบอดสีชนิดต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับมุมมองเห็นตัวเลขในแผ่นทดสอบดังนี้

สำหรับภาพที่ 4.2 A สามารถจำแนกภาวะตาบอดสีชนิดสีแดงและสีเขียว โดยในคนปกติจะมองเห็นเป็นเลข 35

- ภาวะตาบอดสีแดง ชนิด strong protan จะมองเห็นเป็นเลข 5
- ภาวะตาบอดสีแดง ชนิด mild protan จะมองเห็นเป็นเลข (3) 5
- ภาวะตาบอดสีเขียวชนิด strong deutan จะมองเห็นเป็นเลข 3
- ภาวะตาบอดสีเขียว ชนิด mild deutan จะมองเห็นเป็นเลข 3 (5)

สำหรับภาพที่ 4.2 B สามารถจำแนกภาวะตาบอดสีชนิดสีน้ำเงิน-เหลือง (tritan) โดยในคนปกติจะสามารถมองเห็นตัวเลข (เลข 9) ในขณะที่ผู้ที่มีภาวะตาบอดสีชนิดสีน้ำเงิน-เหลือง (tritan) จะไม่สามารถมองเห็นตัวเลขดังภาพที่ 4.2 ข ได้



ภาพที่ 4.2: ภาพ A แสดงแผ่นทดสอบที่ใช้จำแนกภาวะตาบอดสีแดง (strong protan, mild protan) ตาบอดสีเขียว (strong deutan, mild deutan) ภาพ B เป็นแผ่นทดสอบสำหรับจำแนกภาวะตาบอดสีชนิด ภาวะตาบอดสีน้ำเงิน-เหลือง (tritan)

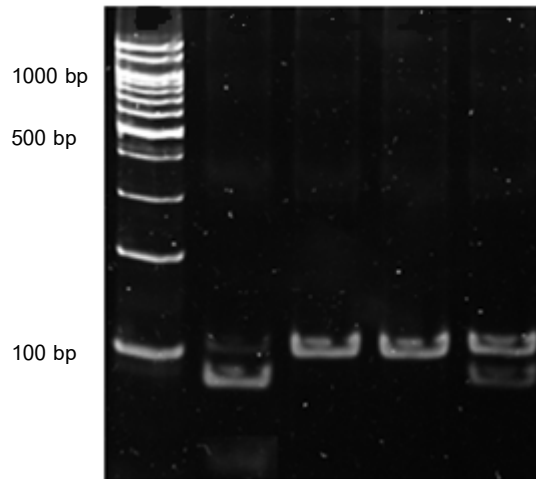
ผลการทดลองในการตรวจภาวะตาบอดสี ในประชากรกะเหรี่ยงพบภาวะตาบอดสีแดง (mild protan) ในผู้หญิง 1 คน จากผู้หญิงทั้งหมด 124 คน หรือ คิดเป็นร้อยละ 0.8 และในผู้ชายทั้งหมด 106 คน พบภาวะตาบอดสีเขียว (strong deutan) และภาวะตาบอดสีแดง-เขียว อย่างละ 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.9

4.2 ความถี่ในหมู่และอัลลีลของการกลายพันธุ์และภาวะพหุสัณฐานต่างๆ ของยีน *G6PD*, *CXorf2/TEX28* และ *OPN1LW/OPN1MW*

4.2.1 ความถี่ในหมู่และอัลลีลของการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Mahidol*

จากการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* ด้วยวิธี PCR-RFLP (ดังภาพที่ 4.3) ในประชากรกะเหรี่ยงทั้งหมด 230 คน พบ hemizygote ในเพศชาย 15 คน จากทั้งหมด 106 คน คิดเป็นร้อยละ 14.2 ส่วนในเพศหญิง พบ homozygote 1 คนจากทั้งหมด 124 คน คิดเป็นร้อยละ 0.8 และ heterozygote 30 คนจากทั้งหมด 124 คน คิดเป็นร้อยละ 24.2 สำหรับกลุ่มประชากรที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (unrelated individual) จำนวน 80 คน พบ hemizygote ในเพศชาย 10 คนจากทั้งหมด 36 คนคิดเป็นร้อยละ 27.8 ในเพศหญิง พบ homozygote 1 คนจากทั้งหมด 44 คน คิดเป็นร้อยละ 2.3 และ heterozygote 9 คนจากทั้งหมด 44 คน คิดเป็นร้อยละ 20.5 เมื่อคำนวณความถี่อัลลีล *G6PD Mahidol* ในประชากรกะเหรี่ยงพบร้อยละ 13.3 ของอัลลีลทั้งหมด โดยความถี่ในหมู่และอัลลีลของ *G6PD Mahidol* ที่วิเคราะห์ได้

เป็นไปตามกฎ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)(103) ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (p -value<0.01) (ดังตารางที่ 4.2)



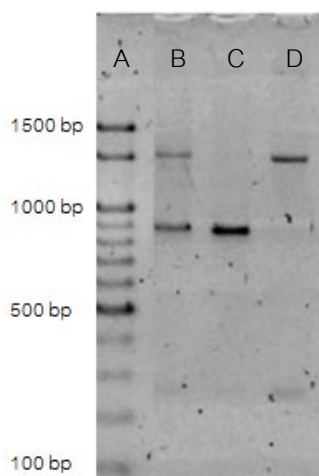
ภาพที่ 4.3: แสดงศึกษาการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยแถว A คือ 100 base pair (bp) DNA marker แถว B คือ ตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol (PCR-RFLP product ขนาด 82 bp และ 22 bp) ตัวอย่าง C,D คือ ตัวอย่างปกติที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol (PCR-RFLP product ขนาด 104 bp) และ ตัวอย่าง E คือ ตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD แบบ heterozygote (PCR-RFLP product ขนาด 104 bp, 82 bp และ 22 bp)

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนชาวกะเหรี่ยงที่พบการกลายพันธุ์ของยีน G6PD แบบ Mahidol ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol

ตัวอย่าง	เพศ	จำนวน (N)	ลักษณะการกลายพันธุ์แบบ G6PD MAHIDOL					HWE P-value
			ความถี่จีโนไทป์			ความถี่อัลลีล		
			GG	GA	AA	G	A	
ประชากรทั้งหมด	ชาย	106	-	-	-	0.86	0.14	-
	หญิง	124	0.75	0.24	0.01	0.87	0.13	0.72
Unrelated individual	ชาย	36		-	-	0.72	0.28	-
	หญิง	44	0.77	0.20	0.03	0.88	0.12	0.95

4.2.2 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28*

จากการศึกษาลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* ด้วยเทคนิค Gap-PCR (ดังภาพที่ 4.4) ในประชากรกระเหรี่ยงทั้งหมด 230 คน พบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ใน 220 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 62.2 ของอัลลีลทั้งหมด 354 อัลลีล และเมื่อพิจารณาเฉพาะอัลลีล G6PD Mahidol จะพบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion จำนวน 44 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 97 ของอัลลีล G6PD Mahidol ทั้งหมด 47 อัลลีล นอกจากนี้ยังศึกษาภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในกลุ่มชายพม่า และมอญ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (12) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol อีกจำนวน 30 อัลลีล โดยอัลลีลทั้งหมดพบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion (ตารางที่ 4.3) อีกทั้งยังได้ศึกษาลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในบุคคลที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด G6PD Viangchan เพิ่มเติมอีกจำนวน 23 อัลลีลในกลุ่มชาวไทย ลาว และเขมร พบว่าอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan ทั้งหมดไม่พบลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4: แสดงการศึกษาลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในยีน *CXorf2/TEX28* ด้วยวิธี Gap-PCR โดยแถว A คือ 100 base pair (bp) DNA marker ในแถว B คือ ตัวอย่างที่พบลักษณะ heterozygote 697 bp deletion (PCR product ขนาด 1555 bp และ 886 bp) แถว C คือ ตัวอย่างที่มีพหุสัณฐานพหุสัณฐาน 697 bp deletion 886 bp (PCR product ขนาด 886 bp) และแถว D คือ ตัวอย่างที่ไม่พบลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion (PCR product ขนาด 1555 bp)

ตารางที่ 4.3 แสดงความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในประชากรกะเหรี่ยง (N คือ อัลลีลปกติ del คือ อัลลีลที่พบ 697 bp deletion)

ตัวอย่าง	เพศหญิง						เพศชาย	
	ความถี่จีโนไทป์			ความถี่อัลลีล		P value จาก HWE	ความถี่อัลลีล	
	N/N	N/del	del/del	N	del		N	del
ประชากรทั้งหมด	0.31	0.46	0.23	0.54	0.46	0.70	0.55	0.45
Unrelated individual	0.34	0.39	0.27	0.54	0.46	0.33	0.42	0.58

ตารางที่ 4.4 แสดงความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ที่พบในประชากรกะเหรี่ยงและชาติพันธุ์อื่นๆ ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดต่างๆ (N คือ อัลลีลปกติ del คือ อัลลีลที่พบ 697 bp deletion)

ชนิด G6PD	จำนวนประชากร (อัลลีล)	ความถี่อัลลีล	
		N	del
G6PD B	307	0.43	0.57
G6PD Mahidol	47 (กะเหรี่ยง) 28 (พม่า มอญ)	0.03	0.97
G6PD Viangchan	23 (ไทย ลาว เขมร)	1.00	0.00

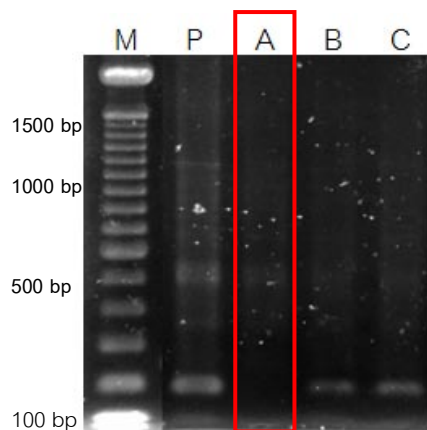
4.2.3 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1LW/OPN1MW*

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ด้วยวิธี sequencing ในตัวอย่างที่พบภาวะตาบอดสีจำนวน 3 คนพบว่า

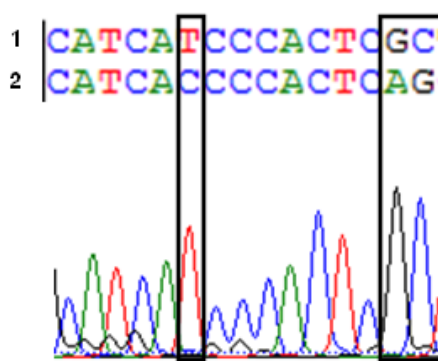
4.2.3.1 ตัวอย่างที่มีภาวะตาบอดสีเขียวชนิด Strong deutan

จากการทำ PCR บริเวณ promoter ของยีน *OPN1MW* ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ในตัวอย่างนี้ (ดังภาพที่ 4.5) จึงคาดการณ์ว่าตัวอย่างนี้ไม่มียีน *OPN1MW* และเมื่อยืนยันด้วยผลจาก sequencing พบว่าไม่มีสัญญาณเบสจากยีน *OPN1MW* แต่พบสัญญาณเบสของยีน *OPN1LW* แทน (ดังภาพที่ 4.6) เนื่องจากยีนทั้งสองจะถูกเพิ่มจำนวนพร้อมๆ กันในการทำ PCR

เพราะยีนทั้งสองมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบส แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างนี้มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *OPN1MW* (ดังภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.5: แสดงผลจากการทำ PCR ของบริเวณ promoter ของยีน *OPN1MW* แถว M คือ 100 base pair (bp) DNA marker แถว P คือ ตัวอย่างควบคุม positive แถว A คือตัวอย่าง strong deutan (ในกรอบสีเขียว) แถว B คือ ตัวอย่าง mild protan แถว C คือตัวอย่างตาบอดสีทั้งแดงและเขียว โดยผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 205 bp



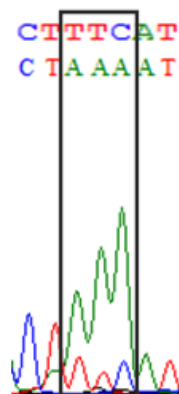
ภาพที่ 4.6: แสดงผลจากการทำ direct sequencing ในบริเวณ exon4 ของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ซึ่งพบแต่สัญญาณเบสของยีน *OPN1LW* โดยในกรอบสีเขียวแสดงเบสที่ จะมีความแตกต่างกันระหว่างยีน *OPN1LW* (นิวคลีโอไทด์แถว 1) และ *OPN1MW* (นิวคลีโอไทด์แถว 2)



ภาพที่ 4.7: แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของตัวอย่างตาบอดสีเขียวชนิด Strong deutan โดยสีเหลี่ยมสีดำแสดงถึงบริเวณ LCR ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *OPN1LW/OPN1MW* และสีเหลี่ยมสีแดงแสดงถึงยีน *OPN1LW*

4.2.3.2 ตัวอย่างที่มีภาวะตาบอดสีแดงชนิด Mild protan

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ไม่พบการกลายพันธุ์ใน exon ทั้ง 6 exon ของทั้งสองยีน แต่พบในบริเวณ LCR โดยเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง จาก TTC เป็น AAA ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน red/green opsin ได้ (ดังภาพที่ 4.8) แต่จากภาพจะเห็นได้ว่าพบสัญญาณของเบส TTC ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวเป็นเพศหญิง จึงทำให้มีสัญญาณของนิวคลีโอไทด์ได้ทั้งจากอัลลีลที่ปกติและอัลลีลที่เกิดการกลายพันธุ์

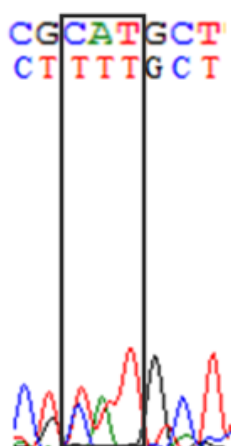


ภาพที่ 4.8: แสดงผลจากการทำ direct sequencing โดยนิวคลีโอไทด์ที่พบการกลายพันธุ์ (ในกรอบสี่เหลี่ยม) อยู่ในบริเวณ LCR ของยีน *OPN1LW/ON1MW*

4.2.3.3 ตัวอย่างที่พบภาวะตาบอดสีทั้งแดงและเขียว

ผลจากการวิเคราะห์ sequence พบ การกลายพันธุ์ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 895-897 ซึ่งอยู่ในบริเวณ exon 5 โดยเปลี่ยนจาก GCA เป็น TTT ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโน Ala288Phe แต่เนื่องจาก PCR ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถเพิ่มจำนวนยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* ได้พร้อมๆ กัน จึงทำให้ PCR product ที่ได้มาจากยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* อย่างไม่ขึ้นกับทั้งสองยีนมีเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 895-897 ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นผลที่ได้จาก

การทำ direct sequencing จึงไม่ควรมึสัญญาณที่ต่างกัน แต่จากผล chromatogram พบสัญญาณของเบส TTT เกิดขึ้น ซ้อนกับเบส GCA (ดังภาพที่ 4.9) ทั้งนี้ไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์ในยีน *OPN1LW* หรือ *OPN1MW* แต่เมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวพบว่าอยู่บน exon 5 ซึ่งเป็น exon ที่สำคัญ ที่ยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* มักจะมีลำดับเบสที่ต่างกัน โดยจะมีผลต่อการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นของรงควัตถุสีแดงและเขียว



ภาพที่ 4.9: แสดงผลจากการทำ direct sequencing ของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ (ในกรอบสี่เหลี่ยม) ใน exon5 ของยีน *OPN1LW/OPN1MW*

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *G6PD*, *CXorf2/TEX28* และ *OPN1LW/OPN1MW*

4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง *G6PD* Mahidol กับ 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28*

จากการศึกษาพบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในอัลลีล *G6PD* Mahidol จำนวน 73 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 97.3 ของอัลลีล *G6PD* Mahidol ทั้งหมด ขณะที่พบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในอัลลีล *G6PD* B (ปกติ) จำนวน 175 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 57.2 ของอัลลีล *G6PD* B ทั้งหมด (ตารางที่ 4.4) เมื่อคำนวณ Linkage disequilibrium (LD) ของอัลลีล *G6PD* Mahidol และภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion จากตัวอย่าง unrelated individuals และโดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของ LD ($|D'|$) ด้วยโปรแกรม CubeX ผลการทดลองที่ได้พบว่าภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion มีความสัมพันธ์แบบ LD กับการกลายพันธุ์แบบ *G6PD* Mahidol ($|D'| = 1$) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าภาวะพหุสัณฐานและการกลายพันธุ์ *G6PD* Mahidol มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดและมีการสืบทอดต่อไปยังรุ่นลูกหลานไปพร้อมๆ กัน

เนื่องจากลักษณะพหุสัณฐาน 697 bp deletion พบได้มากในประชากรกะเหรี่ยง (ร้อยละ 62.2) จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างในชาติพันธุ์อื่นๆ เช่น กลุ่มชาวพม่า และมอญ โดยศึกษาในอัลลีล G6PD Mahidol จำนวน 28 อัลลีล และกลุ่มชาวไทย ลาว และเขมร โดยศึกษาในอัลลีล G6PD Viangchan จำนวน 23 อัลลีล ผลการทดสอบยังคงพบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในอัลลีล G6PD Mahidol เช่นเดิมและไม่พบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในอัลลีล G6PD Viangchan จึงกล่าวได้ว่าภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion และการกลายพันธุ์ G6PD Viangchan ไม่ได้มีความสัมพันธ์กัน

4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล G6PD Mahidol ภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของยีน *CXorf2/TEX28* และการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ที่ก่อให้เกิดภาวะตาบอดสีแดง-เขียว

จากการศึกษาไม่พบอัลลีล G6PD Mahidol ในผู้ที่มีภาวะตาบอดสีแดง-เขียว นอกจากนี้ยังพบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion เพียงตัวอย่างเดียวที่มีภาวะตาบอดสีทั้งแดง-เขียว แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดภาวะตาบอดสีแดง-เขียวนั้นไม่สัมพันธ์กับอัลลีล G6PD Mahidol และภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

ภาวะตาบอดสี (color blindness) เป็นความบกพร่องในการจำแนกสีของตา โดยชนิดที่พบได้บ่อยคือภาวะตาบอดสีแดง-เขียว โดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* ซึ่งทั้งสองยีนตั้งอยู่บนโครโมโซม X ส่วนปลาย q28 โดยมียีน *CXorf2/TEX28* แทรกอยู่ ซึ่งยีน *CXorf2/TEX28* ยังไม่ทราบหน้าที่ แต่มีภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ที่ intron 3 ในยีนดังกล่าว ที่สามารถพบได้ทั้งผู้ป่วยตาบอดสีและคนปกติ นอกจากนี้ในบริเวณโครโมโซม X ตำแหน่ง q28 ส่วน downstream ของยีน *OPN1MW* ไปประมาณ 298 kb ยังพบยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์กลูโคส 6- ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G 6-PD) (3) โดยการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* เป็นสาเหตุของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ซึ่งสามารถพบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้หลายชนิดและมีความแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากรโดยขึ้นอยู่กับเชื้อชาติ ภูมิภาค วิถีวัฒนธรรม และภาษา จากการรายงานก่อนหน้านี้ที่เคย์ศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด Mediterranean มีความสัมพันธ์กับภาวะตาบอดสีเขียวในบริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียนแถบทวีปยุโรป (3) อีกทั้งจากการศึกษาภาวะ positive selection ของรายงานก่อนหน้านี้ (12) พบว่า G6PD Mahidol น่าจะมีความสัมพันธ์กับภาวะพหุสัณฐานชนิด 697 bp deletion ที่ intron 3 ของ *CXorf2/TEX28* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol กับภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ของ *CXorf2/TEX28* ร่วมกับภาวะตาบอดสีในประชากรกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ จำนวน 86 ครอบครัว 230 คน ที่อาศัยอยู่ในจังหวัดสุโขทัย ทางภาคเหนือของประเทศไทย

จากการศึกษาพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในเพศชาย ร้อยละ 14.2 และในเพศหญิงร้อยละ 4.0 และพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกลุ่มตัวอย่างประชากรกะเหรี่ยงที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด ร้อยละ 25 ในเพศชาย และร้อยละ 2.3 ในเพศหญิง โดยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง เนื่องจากยีน *G6PD* อยู่บนโครโมโซมเพศ X ทำให้การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในเพศชายมีลักษณะ hemizygous ที่จะแสดงออกได้อย่างเด่นชัด ในขณะที่เพศหญิงมีโครโมโซมเพศ X สองแท่งจึงเลือกแสดงออกเพียงแท่งเดียว โดยขึ้นกับการเกิด random X chromosome inactivation ที่จะยังยั้งการแสดงออกของโครโมโซมแท่งใดแท่งหนึ่ง ดังนั้นลักษณะฟีโนไทป์ในเพศหญิงที่มีลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygous จึงมีความหลากหลาย โดยขึ้นกับสมดุลของการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่กลายพันธุ์หรือยีนที่ปกติ (77) นอกจากนี้จะพบว่าความชุกของภาวะพร่อง

เอนไซม์ G 6-PD ในชุมชนกะเหรี่ยงนี้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ชาวมอญ พม่า และเขมร ในเพศชาย โดยพบร้อยละ 12, 11 และ 26.1 ตามลำดับ (6, 7, 9) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD พบได้มากในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นผลมาจากภาวะ positive selection ที่ได้รับแรงกระตุ้นจากการระบาดของมาลาเรีย จึงทำให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และถ่ายทอดเพิ่มมากขึ้นในชาวกะเหรี่ยง เพื่อเป็นการป้องกันและลดความรุนแรงของมาลาเรีย (12)

เมื่อศึกษาลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ในประชากรกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอทั้งหมด พบว่าในเพศชายพบร้อยละ 14.2 และในเพศหญิง แบ่งเป็นลักษณะ homozygote พบร้อยละ 0.8 และลักษณะ heterozygote พบร้อยละ 24.2 สำหรับกลุ่มประชากรที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (unrelated individual) จำนวน 80 คน พบร้อยละ 27.8 ในเพศชาย และในเพศหญิงพบลักษณะ homozygote ร้อยละ 2.3 และลักษณะ heterozygote ร้อยละ 20.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol นั้นพบได้มากในกลุ่มประชากรกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ โดยมี allele frequency เท่ากับ 13.3 เช่นเดียวกับชาวพม่า มอญ และกะเหรี่ยงในจังหวัดราชบุรี ที่พบ G6PD Mahidol ถึงร้อยละ 0.07, 0.08 และ 0.24 ตามลำดับ (12) จากผลการทดสอบและข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีการตั้งข้อสังเกตว่าชาวกะเหรี่ยงน่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกับชาวพม่า และมอญ เนื่องจากมีลักษณะการกลายพันธุ์แบบ G6PD Mahidol เหมือนกัน อีกทั้งพบในประชากรในอัตราส่วนที่มาก ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน

จากการศึกษาภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ พบลักษณะตาบอดสีแดง (mild protan) ร้อยละ 0.8 ตาบอดสีเขียว (strong deutan) ร้อยละ 0.9 และยังพบภาวะตาบอดสีทั้งแดงและเขียว ร้อยละ 0.9 โดยร้อยละความถี่ของภาวะตาบอดสีแดง-เขียวที่พบในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอนี้สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ ถึงความของภาวะตาบอดสีในแถบเอเชียพบร้อยละ 3 (14) จากการที่พบภาวะตาบอดสีแดง-เขียวในกลุ่มกะเหรี่ยงได้น้อยในประชากรกะเหรี่ยงและชาวเอเชีย อาจเป็นผลมาจากภาวะ negative selection ของภาวะตาบอดสี ที่จะถูกกำจัด หรือจำกัดให้มีปริมาณน้อย เพื่อให้ความสามารถในการจำแนกสียังคงชัดเจน ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการดำรงชีวิต ในการล่าสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนเผ่าที่ต้องดำรงชีพอยู่ในป่าหรือเทือกเขา จึงเป็นเหตุให้พบภาวะตาบอดสีได้น้อยมากในชาวกะเหรี่ยงกลุ่มปากะญอ

การศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* จากตัวอย่างที่เป็นตาบอดสีเขียวชนิด Strong deutan พบมีการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *OPN1MW* ทั้งยีน ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถมองเห็นสีเขียวได้ โดยสาเหตุของการกลายพันธุ์รูปแบบนี้อาจเกิดจากกระบวนการ unequal recombination เนื่องจากยีนทั้งสองมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก ประกอบกับเรียงตัวกันอย่างต่อเนื่อง จึงอาจทำให้เกิด red/green hybrid genes และ deletion ของยีน green pigment (ภาพที่ 4.7) สำหรับตัวอย่างตาบอดสีแดงชนิด Mild protan พบการกลายพันธุ์ในบริเวณ LCR ของยีน *OPN1LW/OPN1MW* จึงอาจมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *OPN1LW/OPN1MW* ได้ ในขณะที่ตัวอย่างที่ตาบอดสีทั้งแดงและเขียว มีการกลายพันธุ์แบบ substitution โดยเปลี่ยนจากเบส GCA เป็น TTT ในบริเวณ exon 5 ของยีน *OPN1LW* หรือ *OPN1MW* ทำให้เปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 288 จาก Alanine เป็น Phenylalanine ซึ่งการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้ยังไม่พบการรายงานมาก่อน นอกจากนี้พบว่ายีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* จะแตกต่างกันที่ exon 5 ซึ่งมีความสำคัญต่อโครงสร้าง opsin ในการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ต่างกันระหว่าง red opsin และ green opsin ดังนั้นเมื่อยีนมีการกลายพันธุ์และเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ ย่อมส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดเช่นกัน

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และลักษณะตาบอดสีแดง-เขียวในชาวเกาะเหรียญ พบว่าไม่มีตัวอย่างที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD และภาวะตาบอดสีแดง-เขียวร่วมกัน แสดงว่าลักษณะทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งแตกต่างจากการรายงานที่เคยศึกษาในประชากรแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยพบว่าประชากรที่อยู่ในชายฝั่ง Tyrrhenian ที่มีภาวะตาบอดสีเขียว (deuteranopia) ที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1MW* นั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ (linkage disequilibrium; LD) กับการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด Mediterranean 1 (3) อีกทั้งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion กับการกลายพันธุ์ของยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* ที่ก่อให้เกิดภาวะตาบอดสีแดง-เขียว แต่การวิจัยครั้งนี้พบว่าภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion ในยีน *CXorf2/TEX28* ซึ่งเป็นยีนที่แทรกอยู่ระหว่างยีน *OPN1LW* และ *OPN1MW* นั้นมีความสัมพันธ์ร่วมกับอัลลีล *G6PD* Mahidol โดยพบอัลลีล *G6PD* Mahidol ที่มีภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion มากถึงร้อยละ 93 และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion กับการกลายพันธุ์ *G6PD* Mahidol พบว่าภาวะพหุสัญญาณ 697 bp deletion จะถ่ายทอดทางลักษณะทางพันธุกรรมไปพร้อมๆ กับการกลายพันธุ์ *G6PD* Mahidol เนื่องจากมีความสัมพันธ์กันแบบ linked

disequilibrium ($ID'1=1$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในการทดสอบภาวะ positive selection ของ G6PD Mahidol (12) ที่พบว่า G6PD Mahidol น่าจะมีความสัมพันธ์กับภาวะพหุสัณฐานชนิด 697 bp deletion ที่ intron 3 ของ *CXorf2/TEX28* อย่างไรก็ตามผลการวิจัยยังพบว่าภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ไม่ได้พบมากในอัลลีล G6PD mahidol เท่านั้นแต่ยังสามารถพบได้ในอัลลีลปกติ หรือ G6PD B ด้วยเช่นกัน โดยพบได้ร้อยละ 53 ของอัลลีลปกติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าภาวะพหุสัณฐานชนิด 697 bp deletion เป็น polymorphism ที่พบได้บ่อยๆ ในประชากรกะเหรี่ยงจึงทำให้พบมากในอัลลีล G6PD Mahidol เช่นกัน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาภาวะพหุสัณฐานชนิด 697 bp deletion เพิ่มเติมทั้งในอัลลีล G6PD Mahidol ที่มาจากชาวพม่า และมอญ และในอัลลีล G6PD Viangchan ที่มาจากชาวไทย ลาว และเขมร ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า G6PD Mahidol ความสัมพันธ์แบบ linked disequilibrium กับภาวะพหุสัณฐานชนิด 697 bp deletion และไม่มี ความสัมพันธ์กับ G6PD Viangchan เนื่องจากตรวจไม่พบภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion ในอัลลีล G6PD Viangchan จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอัลลีล G6PD Mahidol กับอัลลีล G6PD Viangchan มีอัลลีลต้นกำเนิดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol น่าจะเกิดจากอัลลีลปกติที่มีภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion เมื่อเวลาผ่านไป ทำให้จำนวนอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ร่วมกับภาวะพหุสัณฐาน 697 bp deletion มีจำนวนมากขึ้นและถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานต่อไป โดยงานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม X บริเวณ q28 ของประชากรในแถบ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้

รายการอ้างอิง

- (1) Ueyama H, Torii R, Tanabe S, Oda S, Yamade S. An insertion/deletion TEX28 polymorphism and its application to analysis of red/green visual pigment gene arrays. Journal of human genetics. 49(10) (2004):548-557.
- (2) Wissinger B, Sharpe LT. New aspects of an old theme: the genetic basis of human color vision. American journal of human genetics. 63(5) (1998):1257-1262.
- (3) Filosa S, Calabr V, Lania G, Vulliamy T, Brancati C, Tagarelli A, et al. G6PD haplotypes spanning Xq28 from F8C to red/green color vision. Genomics. 17(1) (1993):6-14.
- (4) Beutler E. G6PD deficiency. Blood. 84(11) (1994):3613-3636.
- (5) Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet.371(9606) (2008):64-74.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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.

- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Lin K, et al. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. Journal of human genetics. 108(6) (2001):445-449.
- (12) 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.
- (13) วิไล ชินธเนศ, ธันวา ตันสถิตย์, มนต์กานต์ ตันสถิตย์. กายวิภาคศาสตร์ของมนุษย์,3. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์เฟื่องฟ้า, 2539.
- (14) Deeb SS, PhD and Motulsky AG, MD. Red-Green Color Vision Defects. GeneReviews™[online]. 2005. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1301/?report=printable>. [2012,Mar]
- (15) Schubert EF. Light Emitting Diodes[online].1994. Available from: <http://www.ecse.rpi.edu/~schubert/Light-Emitting-Diodes-dot-org/chap16/chap16.htm>. [2012,Apr]
- (16) Khorana H. Rhodopsin, photoreceptor of the rod cell. An emerging pattern for structure and function. Journal of Biological Chemistry. 267(1) (1992):1-4.
- (17) Boynton RM. Human color vision,5. New York : Holt, Rinehart and Winston, 1979.

- (18) Chen J, Nakamura T, Ebrey T, Ok H, Konno K, Derguini F, et al. Wavelength regulation in iodopsin, a cone pigment. Biophysical journal.55(4) (1989):725-729.
- (19) Rowe MH. Trichromatic color vision in primates. News in physiological sciences. 17(3) (2002):93-98.
- (20) Yu WP, Grunwald ME, Yau KW. Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a human homolog of the cyclic nucleotide-gated ion channel of retinal cone photoreceptors. FEBS letters. 393(2-3) (1996):211-215.
- (21) Malaivijitnond S. Sensory and motor mechanism. Courseware of General Biology[online]. 2004. Available from: http://www.sc.chula.ac.th/courseware/GenBio105/Sensory-and-motor-mechanism7_12_4.ppt. [2012, Apr]
- (22) Deeb SS. Molecular genetics of colour vision deficiencies. Clinical and Experimental Optometry. 87(4-5) (2004):224-229.
- (23) Wright W. The characteristics of tritanopia. Journal of the Optical Society of America. 42(8) (1952):509-517.
- (24) Weitz C, Miyake Y, Shinzato K, Montag E, Zrenner E, Went L, et al. Human tritanopia associated with two amino acid substitutions in the blue-sensitive opsin. American journal of human genetics. 50(3) (1992):498-507.
- (25) J.M. Cohen. Pediatric Color Vision Testing. In Robert H, Duckman (ed.), Visual development, diagnosis, and treatment of the pediatric patient, pp.331-364.USA: Library of congress Cataloging-in-Publication Data, 2006.
- (26) Hanna MC, Platts JT, Kirkness EF. Identification of a gene within the tandem array of red and green color pigment genes. Genomics.43(3) (1997):384-386.

- (27) Asenjo AB, Rim J, Oprian DD. Molecular determinants of human red/green color discrimination. Neuron. 12(5) (1994):1131-1138.
- (28) Nathans J. The genes for color vision. Scientific American. 260(2) (1989):29-35.
- (29) Hayashi T, Motulsky AG, Deeb SS. Position of a 'green-red' hybrid gene in the visual pigment array determines colour-vision phenotype. Nature genetics. 22(1) (1999):90-93.
- (30) Nathans J, Thomas D, Hogness DS. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. Science. 232(4747) (1986):193.
- (31) Metlapally R, Michaelides M, Bulusu A, Li YJ, Schwartz M, Rosenberg T, et al. Evaluation of the X-linked high-grade myopia locus (MYP1) with cone dysfunction and color vision deficiencies. Investigative ophthalmology & visual science. 50(4) (2009):1552-1558.
- (32) Hanna MC, Platts JT, Kirkness EF. Identification of a gene within the tandem array of red and green color pigment genes. Genomics. 43(3) (1997):384-386.
- (33) Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, Shows TB, Hogness DS. Molecular genetics of inherited variation in human color vision. Science. 232(4747) (1986):203-210.
- (34) Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. Nature genetics. 39(7) (2007):22-29.
- (35) Banerjee S, Fraenkel D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* and from a "high-level" mutant. Journal of bacteriology. 110(1) (1972):155-160.

- (36) Graeve K, Schaewen A, Scheibe R. Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solatum tuberosum* L.). The Plant Journal. 5(3) (1994):353-361.
- (37) Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Adv Hum Genet. 14 (1985):217-329.
- (38) 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.
- (39) Rowland P, Basak AK, Gover S, Levy HR, Adams MJ. The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. Structure. 2(11) (1994):1073-1087.
- (40) Cohen P, Rosemeyer M. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. European Journal of Biochemistry. 8(1) (1969):8-15.
- (41) Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al. Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 4. New York: McGraw-Hill Professional Publishing, 2000.
- (42) Gaetani GF, Kirkman HN, Mangerini R, Ferraris AM. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. Blood. 84(1) (1994):325-330.
- (43) Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood. 73(1) (1989):334-339.

- (44) Luzzatto L, Poggi V. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Wiley Online Library[online]. 1995. Available from: http://www.g6pd.org/Files/Luzzatto_2008.pdf. [2012, Apr]
- (45) Fermi C. and Martinetti P. Studio sul favismo. Ann. Igiene Sper. 15 (1905):76.
- (46) Chan T, Chan W, Weed R. Erythrocyte hemighosts: a hallmark of severe oxidative injury in vivo. British journal of haematology. 50(4) (1982):575-582.
- (47) Fischer T, Meloni T, Pescarmona G, Arese P. Membrane cross bonding in red cells in favic crisis: A missing link in the mechanism of extravascular haemolysis. British journal of haematology. 59(1) (1985):159-169.
- (48) Greene LS. G6PD deficiency as protection against falciparum malaria: an epidemiologic critique of population and experimental studies. American Journal of Physical Anthropology. 36(17) (1993):153-178.
- (49) Kirk JM. Neonatal jaundice: a critical review of the role and practice of bilirubin analysis. Annals of clinical biochemistry. 45(5) (2008):452-462.
- (50) Dem R, Beutler E, Alving AS. The hemolytic effect of primaquine. V. Primaquine sensitivity as a manifestation of a multiple drug sensitivity. Journal of laboratory and clinical medicine. 45(1) (1955):30-39.
- (51) Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. Blood reviews. 10(1) (1996):45-52.
- (52) Heintz B, Bock T, Kierdorf H, Maurin N. Haemolytic crisis after acetaminophen in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Journal of Molecular Medicine. 67(20) (1989):1068.

- (53) 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.
- (54) 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.
- (55) Chevion M, Navok T, Glaser G, Mager J. The Chemistry of Favism-Inducing Compounds. European Journal of Biochemistry. 127(2) (1982):405-409.
- (56) Kattamis C, Kyriazakou M, Chaidas S. Favism: clinical and biochemical data. Journal of medical genetics. 6(1) (1969):34-41.
- (57) Mavelli I, Ciriolo MR, Rossi L, Meloni T, Forteleoni G, Flora A, et al. Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. European Journal of Biochemistry. 139(1) (1984):13-18.
- (58) Sobngwi E, Gautier JF, Kevorkian JP, Villette JM, Riveline JP, Zhang S, et al. High prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency without gene mutation suggests a novel genetic mechanism predisposing to ketosis-prone diabetes. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 90(8) (2005):4446-4451.
- (59) Ekert H, Rawlinson I. Deferoxamine and favism. New England Journal of Medicine. 312(19) (1985):1260.
- (60) Corash L, Spielberg S, Bartsocas C, Boxer L, Steinherz R, Sheetz M, et al. Reduced chronic hemolysis during high-dose vitamin E administration in

Mediterranean-type glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. New England Journal of Medicine. 303(8) (1980):416-420.

- (61) Hafez M, Amar ES, Zedan M, Hammad H, Sorour AH, El-Desouky ESA, et al. Improved erythrocyte survival with combined vitamin E and selenium therapy in children with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and mild chronic hemolysis. Journal of pediatrics. 108(4) (1986):558-561.
- (62) Glock GE, McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochemical Journal. 55(3) (1953):400-408.
- (63) Deutsch J. Maleimide as an inhibitor in measurement of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Clinical chemistry. 24(6) (1978):885-889.
- (64) Morelli A, Benatti U, Lenzerini L, Sparatore B, Salomino F, Melloni E, et al. The interference of leukocytes and platelets with measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of erythrocytes with low activity variants of the enzyme. Blood. 58(3) (1981):642-644.
- (65) VanderJagt D, Garry P, Hunt W. Ascorbate in plasma as measured by liquid chromatography and by dichlorophenolindophenol colorimetry. Clinical chemistry. 32(6) (1986):1004-1006.
- (66) Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. Methaemoglobin reduction test: a new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. Bulletin of the World Health Organization. 22(6) (1960):633-640.
- (67) Jiang J, Ma X, Song C, Lin B, Cao W, Wu S, et al. Using the fluorescence spot test for neonatal screening of G6PD deficiency. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 34(3) (2003):140-142.

- (68) Nagel RL, Roth EFJ. Malaria and red cell genetic defects. Blood. 74(4) (1989):1213-1221.
- (69) Organization WH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Bull World Health Organ. 67(6) (1989):601-611.
- (70) Martin SK. Modified G-6-PD/malaria hypothesis. Lancet. 315(8158) (1980):51.
- (71) 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.
- (72) 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.
- (73) 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.
- (74) Toniolo D, Martini G, Migeon B, Dono R. Expression of the G6PD locus on the human X chromosome is associated with demethylation of three CpG islands within 100 kb of DNA. The EMBO journal. 7(2) (1988):401-406.
- (75) 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.
- (76) Browne E. The inheritance of an intrinsic abnormality of the red blood cell predisposing to drug-induced hemolytic anemia. Johns Hopkins Med Journal. 101 (1957):115-118.

- (77) Racchi O, Mangerini R, Rapezzi D, Rolfo M, Gaetani GF, Ferraris AM. X chromosome inactivation patterns in normal females. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 24(4) (1998):439-447.
- (78) Ferraris A, Giuntini P, Galiano S, Gaetani G. 2-deoxy-glucose-6-phosphate utilization in the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism. American journal of human genetics. 33(2) (1981):307-313.
- (79) Grumbach MM, Morishima A, Taylor JH. Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 49(5) (1963):581-589.
- (80) Mason PJ, Vulliamy TJ, Foulkes NS, Town M, Haidar B, Luzzatto L. The production of normal and variant human glucose-6-phosphate dehydrogenase in cos cells. European Journal of Biochemistry. 178(1) (1988):109-113.
- (81) Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. Blood Cells Molecules and Diseases. 28(2) (2002):93-103.
- (82) Heller P, Best WR, Nelson RB, Becktel J. Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in hospitalized black male patients. New England Journal of Medicine. 300(18) (1979):1001-1005.
- (83) Beutler E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects. Annual review of medicine. 43(1) (1992):47-59.
- (84) Oppenheim A, Jury CL, Rund D, Vulliamy TJ, Luzzatto L. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. Human genetics. 91(3) (1993):293-294.


- (85) Wang J. Nine different glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in a Malaysian population with Malay, Chinese, Indian and Orang Asli (Aboriginal Malaysian) backgrounds. Acta Med Okayama. 62(5) (2008):327-332.
- (86) Luzzatto L. Studies of polymorphic traits for the characterization of populations. African populations south of the Sahara. Israel journal of medical sciences. 9(9) (1973):1181-1194.
- (87) Vulliamy T, D'urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes N, Martini G, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 85(14) (1988):5171-5175.
- (88) 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.
- (89) Beutler E, Kuhl W. The NT 1311 polymorphism of G6PD: G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. American journal of human genetics. 47(6) (1990):1008-1012.
- (90) Beutler E, Lisker R, Kuhl W. Molecular biology of G6PD variants. Biomed. Biochim. Acta. 49(2-3) (1990):236-241.
- (91) Kurdi-Haidar B, Mason PJ, Berrebi A, Ankra-Badu G, Al-Ali A, Oppenheim A, et al. Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. American journal of human genetics. 47(6) (1990):1013-1019.
- (92) Jalloh A, Tantular I, Pusarawati S, Kawilarang A, Kerong H, Lin K, et al. Rapid epidemiologic assessment of glucose-6-phosphate dehydrogenase

- deficiency in malaria-endemic areas in Southeast Asia using a novel diagnostic kit. Tropical Medicine & International Health. 9(5) (2004):615-623.
- (93) Calabro V, Mason P, Filosa S, Civitelli D, Cittadella R, Tagarelli A, et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency revealed by single-strand conformation and sequence analysis. American journal of human genetics. 52(3) (1993):527-536.
- (94) Mcdonagh EM, Whirl-Carrillo M, Garten Y, Altman RB, Klein TE. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. Biomarkers. 5(6) (2011):795-806.
- (95) Yasmin A, Janan N, Akhter R. Assessment of Colour Blindness and Erythrocyte G6PD Enzyme Status among the School Children of Dhaka City. Journal of Bangladesh Society of Physiologist. 4(2) (2010):64-70.
- (96) Ueyama H, Kuwayama S, Imai H, Tanabe S, Oda S, Nishida Y, et al. Novel missense mutations in red/green opsin genes in congenital color-vision deficiencies. Biochemical and Biophysical Research Communications. 294(2) (2002):205–209
- (97) Mizrahi-Meissonnier L, Merin S, Banin E, Sharon D. Variable retinal phenotypes caused by mutations in the X-linked photopigment gene array. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 51(8) (2010):3884-3892.
- (98) Hedrick PW. Genetics of populations. Massachusetts: Jones & Bartlett Learning, 2011.
- (99) Gaunt T, Rodríguez S, Day I. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. BMC bioinformatics. 8(1) (2007):428.

- (100) Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. TRENDS in Genetics. 18(1) (2002):19-24.
- (101) Shifman S, Kuypers J, Kokoris M, Yakir B, Darvasi A. Linkage disequilibrium patterns of the human genome across populations. Human molecular genetics. 12(7) (2003):771-776.
- (102) Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. Nature Reviews Genetics. 4(8) (2003):587-597
- (103) Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, Mccarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy–Weinberg equilibrium testing. European Journal of Human Genetics. 12(5) (2004):395-399.
- (104) Kamboh MI. A laboratory manual for human blood analysis. American Journal of Physical Anthropology. 105(4) (1998):555-556.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

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

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์แบบไม่สมมูลระหว่างความหลากหลายทางพันธุศาสตร์ของยีน ซีเอกซีโออาร์เอฟทู (CXorf2) ในกลุ่มยีนควบคุมการมองเห็นสีแดง-เขียว และการกลายพันธุ์ของยีนจีซีทีดี (G6PD) บนโครโมโซมเอกซีคิวทูเอท (Xq28)

วันที่คำยินยอม วันที่.....เดือน.....ปี.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่ บ้านเลขที่..... หมู่..... หมู่บ้าน..... ตำบล..... อำเภอ..... จังหวัด..... ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

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

ข้าพเจ้ารับทราบว่างานวิจัยนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างเลือด เพื่อศึกษาเพียงการกลายพันธุ์ของยีนสร้างเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส และยีนควบคุมตาบอดสีในห้องปฏิบัติการที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งมีระยะเวลาในการเก็บสารพันธุกรรมจนจบโครงการวิจัย หรือเป็นเวลา 2 ปี


ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติมหลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/ หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้า และสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยไม่ต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

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

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัย รวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในระบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ 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 ความสัมพันธ์แบบไม่สมดุลระหว่างความหลากหลายทางพันธุศาสตร์ของยีน ซีเอกซีโออาร์เอฟทู (CXorf2) ในกลุ่มยีนควบคุมการมองเห็นสีแดง-เขียว และการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกส์พีดี (G6PD) บนโครโมโซมเอกซีคิวทูเอท (Xq28)

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


ข้าพเจ้ารับทราบว่าการวิจัยนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างเลือด เพื่อศึกษาเพียงการกลายพันธุ์ของยีนสร้างเอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส และยีนควบคุมตาบอดสีในห้องปฏิบัติการที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งมีระยะเวลาในการเก็บสารพันธุกรรมจนจบโครงการวิจัย หรือเป็นเวลา 2 ปี

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อ ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติมหลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/ หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

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

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัย รวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในระบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคต หรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์เท่านั้น

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าลงนามหรือประทับลายนิ้วมือของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

.....
(ลายนิ้วมือผู้ยินยอม)

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอม ตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของกรวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือ ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมใน โครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว 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
และการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกส์พีดี (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:.....		

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant) หน้า 1/7</p>
--	--

ชื่อโครงการวิจัย ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนซีเอกซ์โออาร์เอฟทู ในกลุ่มยีนที่ควบคุมการมองเห็นสีแดง - เขียว กับการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีบนโครโมโซมเอ็กซ์คิว 28

ผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวกาญจนาวดี ประสิทธิ์สา

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 วังใหม่ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 089-128-2120

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

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นชาวไทยเชื้อสายกะเหรี่ยง ที่อาศัยอยู่ใน หมู่บ้านแม่सान ตำบลแม่คำ อำเภอศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G6PD) เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันภาวะเครียดซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หากมีการกลายพันธุ์ของยีนกลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส จะส่งผลให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ให้เกิดภาวะดีซ่านในเด็กแรกเกิดและภาวะโลหิตจางเฉียบพลันเมื่อร่างกายได้รับสารกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จากการศึกษาในประชากรภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่า ผู้ที่พร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส มีอยู่ประมาณร้อยละ 7-26 และมีรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ต่างกัน โดยขึ้นกับชาติพันธุ์ที่ได้รับจากบรรพบุรุษ การกลายพันธุ์ที่

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 2/7</p>
--	---

พบได้บ่อยในภูมิภาคนี้มี 2 ชนิด คือ ชนิดเวียงจันทน์ พบได้มากในชาวไทย เขมร และลาว และชนิดมณฑล ซึ่งพบมากในชาวพม่า มอญ และกะเหรี่ยง ในขณะที่ทวีปยุโรปพบว่าชาวเมดิเตอร์เรเนียนที่มาจากชายฝั่งทะเลไทรียีเนียนที่มีการกลายพันธุ์ชนิดเมดิเตอร์เรเนียน มักจะมีภาวะตาบอดสีเขียวที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ของยีนควบคุมการมองเห็นสีเขียวร่วมด้วย จากการศึกษาสำรวจก่อนหน้านี้ในชาวกะเหรี่ยง ทำให้ผู้วิจัยพบว่าการกลายพันธุ์ชนิดมณฑลมีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีนที่อยู่ในกลุ่มควบคุมตาบอดสี แต่อย่างไรก็ดียังไม่มียางานว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดภาวะตาบอดสีด้วยหรือไม่ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทดสอบว่าการกลายพันธุ์ชนิดมณฑลมีความสัมพันธ์กับภาวะตาบอดสีแดง-เขียว งานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่จะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์เพื่ออธิบายความเชื่อมโยงระหว่างภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสกับภาวะตาบอดสีแดง – เขียว

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ


1. เพื่อศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และการกลายพันธุ์ของยีน G6PD
2. เพื่อศึกษาความชุกของภาวะตาบอดสี และการกลายพันธุ์ของยีน *CXorf2 / ITEX28*
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน G6PD กับการกลายพันธุ์ของยีน *CXorf2 / ITEX28* ที่อาจก่อให้เกิดภาวะตาบอดสี

จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 220 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอรวบรวม

1. สอบถามข้อมูล ดังนี้ อายุ เชื้อชาติของท่านและของครอบครัวท่าน และลำดับความสัมพันธ์ในเครือญาติ ของท่านกับอาสาสมัครท่านอื่น
2. ตรวจภาวะพร่องตาบอดสีแดง-เขียวของท่านด้วยแผ่นภาพ เพียงท่านอ่านตัวเลขหรือรูปภาพบนแผ่นภาพดังกล่าว จำนวน 5-6 ภาพ
3. เจาะเลือดของท่านบริเวณต้นแขน โดยจะเจาะเลือดจำนวน 3 มิลลิลิตร 2 หลอด เพื่อตรวจภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งตัวอย่างเลือดที่เหลือ ทางผู้วิจัยจะทำการทำลายทิ้งโดยจะฆ่าเชื้อในเบื้องต้นก่อนทำลาย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขอรวบรวมเวลาของท่านในการทดสอบภาวะตาบอดสีและเจาะเลือดของท่าน ครั้งนี้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น และผู้วิจัยจะแจ้งผลการตรวจให้ท่านทราบ ภายหลังจากครั้ง

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant) หน้า 3/7</p>
--	--

4. เก็บตัวอย่างสารพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากตัวอย่างเลือด เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนสร้างเอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และยีนควบคุมตาบอดสีในห้องปฏิบัติการที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และผู้วิจัยขอเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของท่านจนกว่าจะเสร็จสิ้นการวิจัย

คำแนะนำของการเข้าร่วมโครงการวิจัยในช่วงก่อนการเจาะเลือด

1. ก่อนที่ท่านจะเข้าร่วมโครงการและรับการเจาะเลือด ทางผู้วิจัยพร้อมกับเจ้าหน้าที่อาสาสมัครหมู่บ้าน (อส.ม.) หรือล่ามที่สามารถสื่อสารกับท่านได้ จะให้คำแนะนำต่างๆ กับท่าน เกี่ยวกับภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ทั้งสาเหตุของโรค อาการของโรค การปฏิบัติตัวของผู้ป่วย และการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

2. ในระหว่างการเจาะเลือด ท่านไม่ควรเกร็งแขน หรือดึงแขนกลับเพราะอาจทำให้เข็มบาดเส้นเลือดให้เกิดการบาดเจ็บได้ ส่งผลให้เกิดอาการบวมแดง เป็นจ้ำสีเขียวบริเวณนั้นได้

3. ในระหว่างการเจาะเลือด หากท่านมีอาการหน้ามืด วิงเวียนศีรษะ หรือใจสั่น ควรแจ้งให้เจ้าหน้าที่ทราบ เพื่อให้ได้รับการปฐมพยาบาลเบื้องต้นทันที

คำแนะนำของการเข้าร่วมโครงการวิจัยในช่วงหลังเจาะเลือด

1. เจ้าหน้าที่จะแจ้งให้ท่านทราบผลการวิจัย พร้อมทั้งจะให้คำแนะนำต่างๆ แก่ท่าน ในกรณีที่พบว่าท่านมีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD โดยจะแนะนำในเรื่องการปฏิบัติตัวเพื่อหลีกเลี่ยงอาการแสดงของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD

2. ท่านจะได้รับคำแนะนำในการวางแผนครอบครัวเพื่อป้องกันไม่ให้บุตรมีปัญหาโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และโรคตาบอดสี


ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านตอบแบบสอบถาม หรือตอบคำถามผู้วิจัยตามความสัตย์จริง รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ได้รับการเจาะเลือดและตรวจภาวะตาบอดสีของท่านให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรกดหรือแกะป้ายเตอรียาที่ปิดบริเวณที่เจาะเลือด หรือคลายการพันแขนก่อนเลือดหยุดไหล เพราะอาจทำให้เกิดรอยช้ำหรือแผลติดเชื้อได้

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับในการเข้าร่วมวิจัย คือ

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant) หน้า 4/7</p>
--	--

1. ท่านอาจจะเสียเวลาในการทำงาน หรืออาจประสบอุบัติเหตุได้ในระหว่างการเดินมาเข้าร่วมการวิจัย ณ สถานที่োনามัย
2. ท่านอาจจะรู้สึกไม่สบายใจเมื่อผู้วิจัยสอบถามข้อมูลของท่าน
3. ท่านอาจรู้สึกกลัว เป็นกังวล หรือตื่นเต้นในระหว่างการเจาะเลือด/ ตรวจภาวะตาบอดสี

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ข้าจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือ หน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ เพื่อความปลอดภัยของท่านควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อมีความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น


หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใดๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะได้รับประโยชน์จากการเข้าร่วม คือ ท่านจะได้รับทราบผลการตรวจภาวะตาบอดสีและการทำงานของเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสของท่าน หากผลการตรวจพบว่าท่านได้รับผลกระทบจากภาวะดังกล่าว ท่านจะได้รับคำแนะนำในการดูแลสุขภาพอย่างถูกวิธี เพื่อลดความเสี่ยงที่อาจส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคได้ อีกทั้งท่านจะได้รับคำแนะนำด้านภาววางแผนครอบครัวในการมีบุตร เพื่อป้องกันปัญหาโรคทางพันธุกรรมภายหลังทราบผลการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสและภาวะตาบอดสี แต่ทั้งนี้การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้มีผลทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้นหรือเพิ่ม

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 5/7</p>
--	---

ความรุนแรงของภาวะดังกล่าวแต่อย่างใด นอกจากนี้ผลการรักษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในการเข้าใจถึงความเชื่อมโยงระหว่างภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสของท่าน และภาวะตาบอดสี

ข้อปฏิบัติของท่านขณะเข้าร่วมโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติตามนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลประวัติเชื้อชาติ และเชื้อสายวงศ์ตระกูลของท่าน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านตอบคำถามในการตรวจภาวะตาบอดสีของท่านด้วยความสัตย์จริง

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอมไม่ได้หมายความว่าท่านได้ละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใดๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ ชื่อ อาจารย์ ดร.ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย


ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆ ในการเข้าร่วมโครงการวิจัย (ค่าใช้จ่ายอื่นที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด)

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลงตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาสุขภาพของท่านแต่อย่างใด

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p> <p>หน้า 6/7</p>
--	---

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่านหรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านตั้งครรภ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่ท่านนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่านจะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

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


หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่นๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

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

6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้
7. ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการ โดยไม่ได้รับผลกระทบใดๆ ทั้งสิ้น
8. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
9. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพล บังคับ ช่มชู้ หรือการหลอกลวง
10. ท่านจะได้รับการคำแนะนำด้านการวางแผนครอบครัวในการมีบุตร เพื่อป้องกันปัญหาโรคทางพันธุกรรม ภายหลังจากผลการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสของท่าน และภาวะตาบอดสี
11. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจที่จะอนุญาตให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของท่าน ที่เหลือจากการวิจัยหรือไม่ก็ได้ เพื่อการตรวจเพิ่มเติมในอนาคต หรือเพื่อการศึกษาใหม่ในอนาคต แต่ทั้งนี้การใช้ตัวอย่างนี้ของท่านจะได้รับการยืนยันเรื่องให้คณะกรรมการจริยธรรมพิจารณาอีกครั้ง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย 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

.....

ภาคผนวก ข

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี

1. Trisodium citrate
2. Citric acid
3. Dextrose
4. Glucose-6-phosphate
5. NADP (TPN) sodium salt
(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, sodium salt)
6. Trizme Base
7. Magnesium chloride
8. EDTA
9. Proteinase K
11. Ethanol
12. Isopropanol (Isopropyl Alcohol)
13. Agarose
14. Triton X100
15. Phenol
16. Taq DNA polymerase (Kit)
17. 100 BP sharp ladder DNA marker
19. 30% Acrylamide/Bis
22. SDS
23. Chloroform
24. Sucrose
25. Ammonium persulfate

บริษัทผู้ผลิต

- Fluka chemie AG
- Merck
- Fluka chemie AG
- Sigma-Aldrich Co. LLC.
- Sigma-Aldrich Co. LLC.
- Sigma-Aldrich Co. LLC.
- Bio Basic Inc.
- AMRESCO
- AMRESCO
- Merck
- Merck
- Research Organics
- Sigma
- AMRESCO
- RBC
- RBC
- Bio Rad
- USB
- RCL Labscan
- USB
- USB

เครื่องมือ

2. Centrifuge
3. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer)
4. เครื่อง Thermal Cycler
5. ชุดถ่ายภาพเจล
6. Purification PCR product
7. Vertical gel electrophoresis
8. Horizontal gel electrophoresis
9. Pipette tip (10, 100, 1000 ul)
10. G6PD fluorescent spot test
11. Pseudoisochromatic Plate Ishihara Compatible

บริษัทผู้ผลิต

- Hettich Zentrifugen
National Labnet CO.,Inc.
TECHNE
BIO-RAD Laboratories
RBC Bioscience
BIO-RAD Laboratory
COSMO BIO CO.,LTD.
Axygen Scientific
R&D DIAGNOSTICS LTD.
T.L. Waggeoner,Inc.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	กาญจนาวดี ประสิทธิ์สา
วันเกิด	23 พฤศจิกายน 2530
ที่อยู่	109/70 ซอยราชพัณฑ์ 5 ถนนราชพัณฑ์ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000
อีเมลล์	pippy_pyo@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	2549- 2552 ปริญญาตรี วิชาเอก ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ