นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในทารกแรกเกิดที่มีภาวะตัวเหลืองในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

ปุญญิสา บุญเพ็ง[1,4] บุญชัย บุญวัฒน์[2] ชาญชัย ไตรวารี[3] และ ไข่มุกด์ ช่างศรี[4]

[1]ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า [2]หน่วยเวชพันธุกรรม กองกุมารเวชกรรม [3]หน่วยโลหิตวิทยา กองกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า [4]เทคนิคการแพทยมหาบัณฑิต คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

บทนำ *ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เป็นโรคที่มีความชุกสูงในประเทศไทย มักทำให้เกิดอาการเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันในภาวะที่มี oxidative stress รวมถึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ bilirubin สูงในทารกแรกเกิดบางราย เมื่อมีการสะสมของ bilirubin ในสมองจะทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบประสาทได้* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อให้ทราบถึงชนิดการกลายพันธุ์ (mutation) ในยีน G6PD ที่พบในทารกแรกเกิดที่มีภาวะตัวเหลืองจากภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD* ***วิธีการ*** *ตัวอย่างเลือดทารกแรกเกิดตัวเหลืองจำนวน 110 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD นำมาตรวจหาความผิดปกติของยีน G6PD ด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) ร่วมกับ direct DNA sequencing* ***ผลการศึกษา*** *ทารกแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองร่วมกับการมีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD พบความถี่แอลลีลของการกลายพันธุ์จำนวน 12 ชนิดโดยพบ G6PD Viangchan (871 G>A) (0.390) มากที่สุด รองลงมาได้แก่ G6PD Canton (1376 G>T)(0.130), G6PD Kaiping (1388 G>A) (0.103) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ G6PD Valladolid (406 C>T)(0.014) และ G6PD Aureus (143 T>C)(0.007) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย ค่า microbilirubim ของทารกมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.53 ± 3.05 mg/dL โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศชายและเพศหญิงและไม่พบความสัมพันธ์กับชนิดของการกลายพันธุ์* ***สรุป*** *การกลายพันธุ์ของยีน G6PD ส่วนใหญ่เป็นชนิด G6PD Viangchan (871 G>A), G6PD Canton (1376 G>T) และ G6PD Kaiping (1388 G>A) โดยเฉพาะ G6PD Viangchan (871 G>A) และ G6PD Kaiping (1388 G>A) จัดอยู่กลุ่มที่ถูกกระตุ้นแล้วทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ง่าย การตรวจหาสาเหตุของอาการตัวเหลืองที่มีความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วจะช่วยในการป้องกันและบรรเทาการแตกของเม็ดเลือดแดงได้*

คำสำคัญ: ● *โรคพร่องเอนไซม์ G6PD* ● *ทารกแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง*
● *การตรวจด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)*

เวชสารแพทย์ทหารบก 2561;71:155-62.

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 22 มิถุนายน 2561 ได้ตีพิมพ์เมื่อ 9 สิงหาคม 2561

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ร.ท.หญิง ปุญญิสา บุญเพ็ง ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

Original Article

Molecular Characterization of G6PD Gene Mutation in Neonatal Jaundice in Phramongkutklao Hospital

Poonyisar Boonpeng[1,4], Boonchai Boonyawat[2], Chanchai Traivaree[3] and Khaimuk Changsri[4]

[1]Division of Molecular, Department of Pathology, Phramongkutklao Hospital; [2]Division of Genetic, Department of Pediatric; [3]Division of Hematology, Department of Pediatric, Phramongkutklao Hospital and College of Medicine; [4]Master of Medical Technology Program, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

Abstract:

Introduction: *A high prevalence of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency has been shown in Thailand. This disease can lead to acute hemolytic crisis, neonatal jaundice and kernicterus in some patients.* ***Objective:*** *To study the genotype of G6PD mutation in neonatal jaundice in Phramongkutklao Hospital.* ***Methods:*** *Study the genotype of 110 newborns who presented with neonatal jaundice from G6PD deficiency by High Resolution Melting (HRM) and direct DNA sequencing in Phramongkutklao Hospital.* ***Result****: Twelve G6PD variants have been identified. G6PD Viangchan (871 G>A)(0.390) was the most common identified mutation, followed by G6PD Canton (1376 G>T)(0.130) and G6PD Kaiping (1388 G>A)(0.103) respectively. Moreover, G6PD Valladolid (406 C>T) (0.014) and G6PD Aureus (143 T>C)(0.007) were identified for the first time in Thailand. Mean of microbilirubin was 12.53 ± 3.05 mg/dL and has no correlation with both gender and type of mutations.* ***Conclusion:*** *G6PD Viangchan (871 G>A), G6PD Canton (1376G>T) and G6PD Kaiping (1388 G>A) were the three most common mutations in our study. G6PD Viangchan (871 G>A) and G6PD Kaiping (1388 G>A) were classified into class II which can present acute hemolysis. So, the accurate and rapid testing can prevent and relieve the acute hemolysis in neonatal jaundice.*

Keywords: ● *G6PD deficiency* ● *Neonatal jaundice* ● *High Resolution Melting (HRM)*

RTA Med J 2018;71:155-62.

บทนำ

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย มีหน้าที่หลักในการสร้าง NADPH ซึ่งมีหน้าที่ช่วยป้องกันเซลล์ถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระ (oxidants) ภายในเซลล์[1,2] ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD deficiency) มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่อยู่บนโครโมโซม X มีผลให้ระดับของเอนไซม์ G6PD ลดลงหรือไม่พบเลย หรือมีการทำงานของเอ็นไซม์ที่ผิดปกติ เป็นสาเหตุให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง[3] ส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มักไม่แสดงอาการ การเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกอย่างเฉียบพลันจะเกิดเมื่อมีปัจจัยกระตุ้นต่างๆ หรืออยู่ในสภาวะ oxidative stress เช่น การรับประทานยาบางชนิด (drug-induced acute hemolytic anemia) การติดเชื้อ (infection-induced acute hemolytic anemia) การกินถั่ว *Vicia faba* (Favism) นอกจากนี้ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD อาจพบร่วมหรือคาดว่าเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ โดยเฉพาะ ภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด (neonatal jaundice)[3-5]

ในประเทศไทย จากการศึกษาพบทารกแรกเกิดเพศชายที่เป็น G6PD deficiency มีภาวะ hyperbilirubinemia สูงถึงร้อยละ 49.15[6] ในกรุงเทพมหานครพบทารกแรกเกิดที่มีภาวะตัวเหลืองที่เกิดจากภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในเพศชายร้อยละ 22.1 และเพศหญิงร้อยละ 10.1[7] การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าจะอาศัยการตรวจวัดเชิงปริมาณของเอนไซม์ (quantitative spectrophotometric analysis) ซึ่งยังมีข้อจำกัดคือ อาจพบผลลบปลอม (false negative) ได้ในกรณีที่เลือดมีการแตก (hemolysis) หรือ การมีปริมาณเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนสูง ทำให้ระดับ enzyme activity มีค่าปกติได้[8-10] ดังนั้นการตรวจยืนยันในระดับยีน (mutation analysis) จึงเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD[11] ได้แม่นยำมากกว่าวิธีที่ใช้ตรวจในปัจจุบัน ซึ่งจะทำให้สามารถวางแผนการรักษา และการให้คำแนะนำเกี่ยวกับความรุนแรงของโรค การเฝ้าระวังการเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในอนาคตให้แก่ผู้ป่วยได้อีกด้วย

จากข้อมูลสำรวจความชุก (prevalence) ทั่วโลกพบ G6PD variants มากกว่า 400 ชนิด แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติโดยเฉพาะ activity ของเอ็นไซม์ที่ต่างกันออกไปตั้งแต่ต่ำมากไปจนถึงระดับปกติ ทำให้มีลักษณะอาการทางคลินิคที่แตกต่างกันด้วย จากรายงานการสำรวจในประเทศไทย พบการกลายพันธุ์ชนิดที่เกิดจากการแทนที่ของกรดนิวคลิอิค (substitution) มากกว่า 15 ชนิด ชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ *G6PD Viangchan (871 G>A), G6PD Canton (1376 G>T), G6PD Mahidol (487 G>A), G6PD Kaiping (1388 G>A), G6PD Union (1360 C>T)* และ *G6PD Chinese-5 (1024 C>T)*[7,11-15] ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* หลายวิธี เช่น PCR restriction enzyme (PCR/RE)[7,16,17], microarray[18], amplification refractory mutation system[19] เป็นต้น ซึ่งวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เครื่องมือจำเพาะ ต้องอาศัยความชำนาญในการทำและการแปลผล อีกทั้งต้องใช้ระยะเวลานานในการตรวจด้วย ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค High Resolution Melting analysis (HRM) มาใช้ในการตรวจหาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *G6PD* ที่ทำให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ได้หลายชนิดพร้อมกัน นอกจากสามารถบอกลักษณะและชนิดของการกลายพันธุ์ได้แล้ว ยังช่วยลดระยะเวลาในการตรวจได้อีกด้วย[20-22] ซึ่งผู้วิจัยได้นำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ในเด็กทารกแรกเกิดตัวเหลือง ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือดของทารกแรกเกิดตัวเหลืองจำนวน 110 ราย (เพศชาย 74 ราย และเพศหญิง 36 ราย) ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี quantitative spectrophotometric ณ ห้องปฏิบัติการห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง ตุลาคม ปี พ.ศ. 2560 เพศชายมีระดับเอนไซม์ G6PD ต่ำกว่า 159 IU/mL RBC และเพศหญิงมีระดับเอนไซม์ G6PD ต่ำกว่า 197 IU/mL RBC โดยงานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 3 สาขาวิทยาศาสตร์และคณะอนุกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทย์ทหารบก

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ใช้น้ำยาสำเร็จรูป Axy-Prep™ (blood genomic DNA kit) ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Viangchan (871 G>A)* และ *G6PD Mahidol (487 G>A)* ด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)[22] ในเบื้องต้นก่อน ตัวอย่างที่ให้ผลลบ (negative) จะ

ส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ต่อไป โดย Primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ HRM (Table 1) ทำการตรวจวิเคราะห์ HRM ด้วยเครื่อง CFX96 (Bio-Rad, CA, USA) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction; PCR) ในปริมาตร 20 μL ต่อหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA 50 ng, Forward primer 0.2 μM, Reverse primer 0.2 μM และ 1x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, CA, USA) โดยใช้ initial denaturation 98˚C 2 นาที, 35 รอบของ denaturation 98˚C 10 วินาที, annealing 62˚C 5 วินาที และ extension 72˚C 15 วินาที หลังจากขั้นตอนเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้ว ทำการตั้งอุณหภูมิ 95˚C 1 นาที และ 65˚C 30 วินาที เพื่อเตรียมเข้าสู่กระบวนการ melting analysis โดยกำหนดให้มีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิตั้งแต่ 65-95˚C ที่อัตรา 0.02˚C ต่อวินาที ในการอ่านค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและวิเคราะห์ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่า melting temperature (Tm) ของ PCR product ด้วย Precision Melt Analysis™ Software 1.1 (Bio-Rad, CA, USA) วิเคราะห์เทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ทราบลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แล้ว

การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (direct DNA sequencing) ใช้ Primer เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่ง exon 2 ถึง exon 13 ของยีน *G6PD* (Table 2) โดยในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตร 50 μL ประกอบด้วย DNA 100 ng, Forward primer 0.2 μM, Reverse primer 0.2 μM, dNTP 200 μM, 1x Standard *Taq* buffer และ 1 unit ของ Taq DNA polymerase enzyme (New England BioLabs, USA) ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น T-gradient (Biometra) ที่ Initial denaturation 95˚C 5 นาที denaturation 95˚C 30 วินาที, annealing 62-72˚C 60 วินาที และ extension

Table 1 Primer สำหรับการทำ High Resolution Melting[20]

Mutation	5'-->3'	ขนาด (bp)
Mahidol (487 G>4)	F: GCA GCT CTG ATC CTC ACT CC	137
	R: GGT TGG ACA GCC GGT CA	
Viangchan (871 G>A)	F: CC AAC TCA ACA CCC AAG GA	86
	R: TGG CCT GCA CCT CTG AGA T	

Table 2 Primer สำหรับการทำ direct DNA sequencing

Exon		5'-->3'	PCR product size
2	F:	CTCAAGAAAGGGGCTAACTTCTCAA	241
	R:	GCACTTCCTGGCTTTTAAGATTGGG	
3-4	F:	CAGCCACTTCTAACCACACACCT	352
	R:	CCGAAGCTGGCCATGCTGGG	
5	F:	CTGTCTGTGTGTCTGTCTGTCC	291
	R:	AGCCTGGCAGGCGGGAAGG	
6-7	F:	ACTCCCCGAAGAGGGGTTCAAGG	586
	R:	GAAGAGTAGCCCTGCAGGGTGACT	
8	F:	GGAGCTAAGGAGAGCTCTGGC	164
	R:	GGCATGCTCCTGGGGACTGGG	
9-10	F:	CAAGGAGCCCATCTCTCCCTT	638
	R:	AGGCCGCCCACCCTCCACA	
11-13	F:	GCAGGCAGTGGCATCAGCCAAG	548
	R:	GGGAAGGAGGGTGGCCGTGG	

72 ˚C 5 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 ˚C 5 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบขนาด PCR product ที่ได้ด้วย electrophoresis บนแผ่น 2% agarose ก่อนส่งตรวจ direct DNA sequencing

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลเชิงปริมาณนำเสนอโดยค่าสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ microbilirubin ระหว่างเพศชายและเพศหญิงด้วย Student's t-test และวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ microbilirubin กับการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดต่างๆ ด้วย One-way ANOVA โดยผลการวิเคราะห์ทางสถิติจะถือว่ามีนัยสำคัญเมื่อค่า p-value น้อยกว่า 0.05

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) จากตัวอย่างจำนวน 110 ราย เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM แล้วพบ *G6PD Viangchan (871 G>A)* จำนวน 56 ราย (hemizygous 36 ราย, heterozygous 19 ราย และ homozygous 1 ราย) *G6PD Mahidol (487 G>A)* จำนวน 7 ราย (hemizygous 5 ราย และ heterozygous 2 ราย)

ผลการศึกษาลักษณะพันธุกรรม (genotype) ด้วยวิธี direct DNA Sequencing จากตัวอย่างที่เหลือจำนวน 50 ราย ผล direct DNA sequencing พบ *G6PD Canton (1376 G>T)* จำนวน 19 ราย (hemizygous 12 ราย และ heterozygous 7 ราย), *G6PD Kaiping (1388 G>A)* จำนวน 15 ราย (hemizygous 12 ราย และ heterozygous 3 ราย), *G6PD Chinese-4 (392 G>T)* จำนวน 4 ราย (hemizygous 1 ราย และ heterozygous 3 ราย), *G6PD Valladolid (406 C>T)* จำนวน 2 ราย (hemizygous และ heterozygous อย่างละ 1 ราย), *G6PD Songklanakarin (196 T >A)* จำนวน 2 ราย (hemizygous 2 ราย) และพบ *G6PD Mediterranean (563 C>T), G6PD Coimbra (592 C>T), G6PD Chinese-5 (1024 C>T), G6PD Union (1360 C>T)* และ *G6PD Aures (143 T>C)* ชนิดละ 1 ราย (พบเป็น hemizygous ทั้งหมด) (Table 3)

ความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* จาก Table 3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ตัวอย่าง 110 ราย (เพศชาย 74 ราย และเพศหญิง 36 ราย) ด้วยวิธี HRM ร่วมกับ DNA sequencing พบ *G6PD Viangchan (871 G>A)* มีความถี่การกลายพันธุ์สูงที่สุด คือ 0.39 โดยพบเพศหญิง 1 รายที่มีลักษณะ

Table 3 ความถี่แอลลีลและความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ชนิดต่างๆ ของทารกแรกเกิดตัวเหลือง

ชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD*	ชาย (74)	หญิง (36)		ความถี่แอลลีล	ความถี่ยีน
	Hemizygous	Heterozygous	Homozygous		
G6PD Viangchan (871 G>A)	36	19	1	0.390	0.509
G6PD Canton (1376 G>T)	12	7		0.130	0.173
G6PD Kaiping (1388 G>A)	12	3		0.103	0.136
G6PD Mahidol (487 G>A)	5	2		0.048	0.064
G6PD Chinese- 4 (392 G>T)	1	3		0.027	0.036
G6PD Valladolid (406 C >T)	1	1		0.014	0.018
G6PD Songkla-nagarind (196 T >A)	2			0.014	0.018
G6PD Mediterranean (563 C>T)	1			0.007	0.009
G6PD Coimbra (592 C>T)	1			0.007	0.009
G6PD Chinese-5 (1024 C>T)	1			0.007	0.009
G6PD Union (1360 C>T)	1			0.007	0.009
G6PD Aureus (143 T>C)	1			0.007	0.009

Table 4 ค่า microbilirubin ในการกลายพันธุ์แต่ละชนิดของยีน *G6PD*

ชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD*	Microbilirubin (mg/dL)		p-value[1]
	เพศชาย	เพศหญิง	
G6PD Viangchan (871 G>A)	13.1 ± 2.8 (N = 36)	11.8 ± 2.4 (N = 20)	0.098
G6PD Canton (1376 G>T)	11.8 ± 4.4 (N = 12)	14.3 ± 3.6 (N = 7)	0.201
G6PD Kaiping (1388 G>A)	11.5 ± 2.9 (N = 12)	12.3 ± 0.7 (N = 3)	0.690
G6PD Mahidol (487 G>A)	13.2 ± 1.2 (N = 5)	12.0 ± 2.8 (N = 2)	0.434
การกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ	12.4 ± 4.0 (N = 9)	13.2 ± 2.8 (N = 4)	0.749
p-value[2]	0.570	0.302	

[1]ค่า microbilirubin ระหว่างเพศชายและเพศหญิงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Student's t-test)

[2]ค่า microbilirubin ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (One-way ANOVA)

homozygous รองลงมาคือ *G6PD Canton (1376G>T)* 0.13, *G6PD Kaiping (1388 G>A)* 0.103, *G6PD Mahidol (487 G>A)* 0.048, *G6PD Chinese-4 (392 G>T)* 0.027, *G6PD Songklanagarind (196 T>A)* และ *G6PD Valladolid (406 C>T)* ชนิดละ 0.014 และพบ *G6PD Mediterranean (563 C>T)*, *G6PD Coimbra (592 C>T)*, *G6PD Chinese-5 (1024 C>T)*, *G6PD Union (1360 C>T)*, *G6PD Aureus (143 T>C)* ทั้ง 5 การกลายพันธุ์มีความถี่แอลลีนเท่ากัน คือ 0.007 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ microbilirubin (MB) กับชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD*

จากตัวอย่าง 110 รายระดับ microbilirubin สูงสุดคือ 20.0 mg/dL และมีค่าเฉลี่ย 12.53 ± 3.05 mg/dL เมื่อจัดกลุ่มตามชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* พบว่าการกลายพันธุ์แต่ละชนิดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ microbilirubin รวมถึงไม่พบความแตกต่างของระดับ microbilirubin ระหว่างเพศชาย (hemizygous) และเพศหญิง (heterozygous) ด้วย (Table 4)

วิจารณ์

โรคภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ส่วนใหญ่พบเป็นการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (point mutation)[23] ในประเทศไทยมีความชุกของโรคนี้สูงและมีการศึกษาความหลากหลายในการกลายพันธุ์ของยีนด้วยหลากหลายวิธี[7,11-15] แต่เนื่องจากความหลากหลายของการกลายพันธุ์ ทำให้การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ทุกชนิดเป็นไปได้ยาก และมีข้อจำกัดทางด้านเทคนิคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นความจำเพาะ ความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ การอ่านและแปลผล ตลอดจนภาระค่าใช้จ่ายที่มีราคาสูง จากการวิจัยที่ผ่านมาได้นำเทคนิคการตรวจด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD*[20-22] ซึ่งผู้วิจัยได้นำวิธีการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ค้นหาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* โดยเลือกชนิดที่พบได้บ่อย 2 ชนิดในประเทศไทย คือ *G6PD Viangchan (871 G>A)* และ *G6PD Mahidol (487 G>A)* ซึ่งผลที่ได้คือสามารถแยกลักษณะทางพันธุกรรมออกเป็น ปกติ (wild type), พาหะ (heterozygous) และ เป็นโรค (homozygous หรือ hemizygous) ได้อย่างชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้า[20-21] ที่ต้องมีการผสม DNA ของเพศชายที่มียีน *G6PD* ปกติ (reference DNA) ลงไปด้วยเนื่องจากไม่สามารถแยกลักษณะกราฟของผู้ที่ปกติ (wild type) ออกจากกราฟผู้ที่เป็นโรค (homozygous หรือ hemizygous) ได้ ซึ่งการวิจัยนี้เป็นการนำวิธี High Resolution Melting (HRM) มาประยุกต์ใช้กับการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* เพียง 2 ชนิดแรกที่มีรายงานพบได้บ่อยในประเทศไทย และควรมีการศึกษาในชนิดอื่นๆ ต่อไป

การศึกษาความถี่แอลลีลของการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *G6PD Viangchan (871 G>A)* มีความถี่ของยีนสูงที่สุด คือ 0.39 ส่วนการกลายพันธุ์ที่พบรองลงมาได้แก่ *G6PD Canton (1376 G>T)* และ *G6PD Kaiping (1388 G>A)* ตามลำดับ ซึ่ง 3 อันดับแรกนี้ มีความแตกต่างจากการศึกษาความชุกการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ในประเทศไทยก่อนหน้านี้[7,17] คือพบ *G6PD Kaiping (1388 G>A)* เพิ่มขึ้นมาแทนที่ *G6PD Mahidol (487 G>A)* การเปลี่ยนแปลงความถี่ของการกลายพันธุ์นั้นอาจเกิดจากการย้ายถิ่นที่อยู่อาศัยของประชากรในภูมิภาคต่างๆ[24] อีกทั้งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ตัวอย่างทั้ง 110 ราย ได้ถูกตรวจจนทราบชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ซึ่งพบ *G6PD Valladolid (406 C>T) และ G6PD Aureus (143 T>C)* ซึ่งยังไม่มีการรายงานในประเทศไทย[7,11-15] นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *G6PD Chinese-4 (392 G>T), G6PD Songklanagarind (196 T>A), G6PD Mediterranean (563 C>T), G6PD Coimbra (592 C>T), G6PD Chinese-5 (1024 C>T)* และ *G6PD Union (1360 C>T)* ด้วย

เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงหรือปริมาณ microbilirubin เช่น การสัมผัสสารเคมีบางชนิด การติดเชื้อ ภาวการณ์แตกทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) การมีพยาธิสภาพที่ตับแล้วทำให้การ conjugate bilirubin ลดลง ร่วมถึงการมีความผิดปกติทางพันธุกรรมอื่นๆ เช่น การกลายพันธุ์ยีน *UGT*, Gilbert syndrome เป็นต้น[24-26] ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ระดับ bilirubin ในเลือดสูงถึง 18 mg/dL จากรายงานในประเทศอินเดีย[27] เช่นเดียวกับงานวิจัยในประเทศอิหร่านได้รายงานระดับ bilirubin เฉลี่ยระหว่างเด็กแรกเกิดปกติกับ G6PD deficiency นั้นมีความแตกต่างกันได้แก่ 18.14 ± 3.85 mg/dL และ 22.26 ± 8.36 mg/dL ตามลำดับ[28] ส่วนระดับ microbilirubin ในทารกแรกเกิดตัวเหลืองที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้มีค่าเฉลี่ย 12.53 ± 3.05 mg/dL ซึ่งน้อยกว่ารายงานดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสูงสุดที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานก่อนหน้าสูงถึง 20 mg/dL เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ microbilirubin กับการกลายพันธุ์แต่ละชนิดและเพศในทางสถิติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งชนิดการกลายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในความรุนแรงชนิด class II (ตามการจัดกลุ่มโดย WHO) จึงไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวได้อย่างชัดเจน

สรุป

ทารกแรกเกิดตัวเหลืองที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ตรวจพบกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ด้วยวิธี HRM และ DNA sequencing ได้ถึง 7 ชนิดโดยความถี่แอลลีลส่วนใหญ่เป็นชนิด *G6PD Viangchan (871 G>A)*, *G6PD Canton (1376 G>T)* และ *G6PD Kaiping (1388 G>A)* ตามลำดับ โดยเฉพาะ *G6PD Viangchan (871 G>A)* และ *G6PD Kaiping (1388 G>A)* จัดอยู่ใน G6PD deficiency class II ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีระดับเอนไซม์เฉลี่ยประมาณร้อยละ 1-10 มีปริมาณ microbilirubin สูงระหว่าง 4.4-20.0 mg/dL แม้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์กับปริมาณ microbilirubin ซึ่งอาจเกิดจากมีปัจจัยหลายประการที่ทำให้เกิดอาการตัวเหลืองในทารกแรกเกิด การกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบอาจเป็นปัจจัยหลักหรือปัจจัยร่วมที่จะยิ่งเพิ่มระดับความรุนแรงของอาการตัวเหลือง ผลการศึกษานี้สามารถนำไปกำหนดมาตรการดูแลรักษาเด็กทารกแรกเกิดตัวเหลือง รวมทั้งการป้องกันที่ผู้ป่วยจะได้รับผลกระทบของยาและการรักษาต่อภาวะอ่อนไหวของการขาดเอนไซม์ G6PD ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. *Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency. Hematol Oncol Clin N Am. 2016;30:373-93.*
2. *Filosa S, Fico A, Paglialunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, et al. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. Biochem J. 2003;370(Pt 3):935-43.*
3. *Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. Blood. 2008;111:16-24.*
4. *Hecker PA, Lionetti V, Ribeiro RF, Jr., Rastogi S, Brown BH, O'Connell KA, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency increases redox stress and moderately accelerates the development of heart failure. Circ Heart Fail. 2013;6:118-26.*
5. *Luzzatto L, Seneca E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. Br J Haematol. 2014;164:469-80.*
6. *Tanphaichitr VS, Pung-amritt P, Yodthong S, Soongswang J, Mahasandana C, Suvatte V. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the newborn: its prevalence and relation to neonatal jaundice. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1995;26(Suppl 1):137-41.*

7. *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. Hum Mutat. 2002;19:185.*
8. *Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. Am Fam Physician. 2005;72:1277-82.*
9. *Travis SF, Kumar SP, Paez PC, Delivoria-Papadopoulos M. Red cell metabolic alterations in postnatal life in term infants: glycolytic enzymes and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Pediatr Res. 1980;14:1349-52.*
10. *Mesner O, Hammerman C, Goldschmidt D, Rudensky B, Bader D, Kaplan M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in male premature and term neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004;89:F555-7.*
11. *Charoenkwan P, Tantiprabha W, Sirichotiyakul S, Phusua A, Sanguansermsri T. Prevalence and molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2014;45:187-93.*
12. *Ninokata A, Kimura R, Samakkarn U, Settheetham-Ishida W, Ishida T. Coexistence of five G6PD variants indicates ethnic complexity of Phuket islanders, Southern Thailand. J Hum Genet. 2006;51:424-8.*
13. *Bancone G, Chu CS, Somsakchaicharoen R, Chowwiwat N, Parker DM, Charunwatthana P, et al. Characterization of G6PD genotypes and phenotypes on the northwestern Thailand-Myanmar border. PLoS One. 2014;9:e116063.*
14. *Glomglao W, Chansing K, Treesucon A, Siraprapapat P, Thongnoppakhun W, Sanpakit K, et al. Direct detection for G6PD Bangkok and G6PD Bangkok Noi mutations in the families with chronic nonspherocytic hemolytic anemia (CNSHA). Int J Lab Hematol. 2015;37:e21-4.*
15. *Laosombat V, Sattayasevana B, Janejindamai W, Viprakasit V, Shirakawa T, Nishiyama K, et al. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in the south of Thailand and identification of a novel variant (G6PD Songklanagarind). Blood Cells Mol Dis. 2005;34:191-6.*
16. *Huang CS, Hung KL, Huang MJ, Li YC, Lui H, Tang TK. Neonatal jaundice and molecular mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient newborn infants. Am J Hematol. 1996;51:19-25.*
17. *Singhamatr P, Wanotayan R, Suwanjunee S, Phudharaksa T, Laibua B, Meekaewkuhchorn A. Biochemical and molecular analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase in red blood cells. Thai Pediatric J. 2009;16:157-65.*
18. *Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhensong L. Rapid detection of common Chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by microarray-based assay. Am J Hematol. 2004;76:405-12.*
19. *Du CS, Ren X, Chen L, Jiang W, He Y, Yang M. Detection of the most common G6PD gene mutations in Chinese using amplification refractory mutation system. Hum Hered. 1999;49:133-8.*
20. *Meichen P, Min L, Lin Y, Jiaoren W, Xiaofen Z, Ying Z, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations detection by improved high-resolution DNA melting assay. Mol Biol Rep. 2013;40:3073-82.*
21. *Jing-bin Y, Hong-ping X, Can X, Zhao-rui R, Guo-li T, Fanyi Z, et al. Rapid and reliable detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis. J Mol Diagn. 2010;12:305-11.*
22. *Joly P, Lacan P, Garcia C, Martin C, Francina A. Rapid genotyping of two common G6PD variants, African (A-) and Mediterranean, by high-resolution melting analysis. Clin Biochem. 2010;43:193-7.*
23. *Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. Blood Cells Mol Dis. 2012;48:154-65.*
24. *Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a potential source of severe neonatal hyperbilirubinemia and kenicterus. Seminars in Neonatology. 2002;7:121-8.*
25. *WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Bulletin of the World Health Organization. 1989;67:601-11.*
26. *Memon N, Weinberger B, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of bilirubin clearance. Pediatr Res. 2016;79:378-86.*
27. *Agrawal SK, Kumar P, Rathi R, Sharma N, Das R, Prasad R, et al. UGT1A1 gene polymorphisms in North Indian neonates presenting with unconjugated hyperbilirubinemia. Pediatr Res. 2009;65:675-80.*
28. *Iranpour R, Akbar MR, Haghshenas I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonates. Indian J Pediatr. 2003;70:855-7.*