บทที่ 1

บทนำ

จากข้อมูลด้านประวัติศาสตร์ Professor C.S. Coon (อ้างถึงใน สุรินทร์ ภู่ขจร และคณะ, 2534) จัดพวกซาไกว่าเป็นกลุ่มชาติพันธุ์โอเชียนนิกรอยด์ (Oceanic Negroid) และ John H. Brandt (1965) กล่าวว่าซาไกในประเทศไทยและชาวชองที่อาศัยอยู่ตามเขตชายแดนไทยกัมพูชาจะมีผมหยิกเหมือนนิกริโต (Negrito) ซึ่งเป็นเผ่าพันธุ์ที่กระจัดกระจายตามพื้นที่ต่าง ๆ ในทวีปเอเชีย จึงเป็นข้อสงสัยว่าชนเผ่าซาไกและชาวชองนี้มีต้นกำเนิดมาจากที่ใด ได้มีการนำความรู้ด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) มาช่วยตอบข้อสงสัยเกี่ยวกับต้นกำเนิดหรือความสัมพันธ์ของชาติพันธุ์ระหว่างกลุ่มชนต่างๆ โดยทำการศึกษาดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสม (DNA polymorphisms) หรือดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ (DNA haplotypes) ซึ่งอาศัยโพลีมอร์ฟิก เรสตริกชั่นไซท์ (polymorphic restriction sites) หลาย ๆ ตำแหน่งภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน (β-globin gene cluster) (Orkin และคณะ, 1982) ในยุคแรกๆนิยมใช้เทคนิค RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) แล้วตรวจสอบด้วยวิธี Southern blotting (Southern, 1975) ที่เลือกกลุ่มยีนบีตา-โกลบินเพราะยีนแต่ละตัวในกลุ่มนี้ได้รับการโคลน (clone) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ไว้แล้วจึงเป็นประโยชน์ในการศึกษามิวเตชั่น (mutation) และโพลีมอร์ฟิสมที่เกิดในยีนแต่ละชนิดได้ (สุพรรณ ฟู่เจริญ และกุลนภา ฟู่เจริญ, 2534)

ช่วงทศวรรษที่ผ่านมาความก้าวหน้าด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมีมากขึ้นและได้มีการนำเทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Saiki และคณะ, 1985) มาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบินชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) แล้วตรวจสอบโดยวิธี เจล อิเลคโตรโฟเรซีส (gel

electrophoresis) และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จากนั้นส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) เทคนิคนี้ทำได้ง่ายรวดเร็วและตัดความยุ่งยากของวิธี Southern blotting (Fukumaki และ Fucharoen, 1991)

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงผลการสำรวจชนิดฮีโมโกลบินในชนเผ่าซาไกที่อาศัยอยู่ในอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง และชาวชองที่อยู่ในเขตตำบลคลองพลู อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี รวมทั้งผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ซึ่งอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด และโพลีมอร์ฟิก เรสตริกชั่นไซท์ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน 7 ตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งที่ 1, 5′ε-HincII 2, Gγ-HindIII 3, Aγ-HindIII 4, ψβ-HincII 5, 3′ψβ-HincII 6, β-AvaII และ 7,3′β-BamHI (Fukumaki และ Fucharoen, 1991) ซึ่งในกลุ่มชนชาวชองนี้ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาด้านนี้มาก่อน เมื่อได้ลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบินในชนเผ่าซาไกและชาวชองแล้วนำไปเปรียบเทียบกับแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบินที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว เช่นในชนกลุ่มประเทศเอเชียอาคเนย์ (Antonarakis และคณะ, 1982; Nakatsuji, Kutlar และ Huisman, 1986; Hundrieser และคณะ, 1988b; Yongvanit และคณะ, 1989), ชาวอัสสัมในประเทศอินเดีย (Hundrieser และคณะ, 1988a), ชนกลุ่มประเทศทางยุโรป (Kazazian และคณะ, 1984) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตา-โกลบินเพื่อบอกถึงต้นกำเนิดหรือความสัมพันธ์ของชาติพันธุ์ระหว่างกลุ่มชนต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาความถี่ยีนบีตาอีโกลบินในชนเผ่าซาไก อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง และชาวชอง ตำบลคลองพลู อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
- เพื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตา-โกลบินในชนเผ่าทั้งสองโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อบอกถึงต้นกำเนิด หรือความสัมพันธ์ของชาติพันธุ์ระหว่างกลุ่มชนต่าง ๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับศึกษาความถี่ยีนบีตาอีโกลบิน ในชนเผ่าซาไก และชาวซอง
- ทำให้ทราบลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตา-โกลบินในชนเผ่าทั้งสอง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อบอกถึงต้นกำเนิดหรือความสัมพันธ์ของชาติพันธุ์ระหว่างกลุ่มชนต่าง ๆได้ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มชนอื่น ๆ ต่อไป

การตรวจสอบเอกสาร

ความรู้พื้นฐานที่ควรทราบในการศึกษาครั้งนี้คือ

- ชนเผ่าซาไก
- ชาวซอง
- กลุ่มยีนบีตา-โกลบิน
- การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า
- การตรวจวัดปริมาณ HbA_2 และ HbE ด้วยวิธีไมโครคอลัมน์ โครมาโตรกราฟี
- เทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น
- ยีน HbE กับเทคนิคเอเอสพีซีอาร์
- ยีน HbE กับการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน
- พีซีอาร์กับการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน

ชนเผ่าซาไก (Sakai tribe)

ซาไกมีชื่อเรียกหลายชื่อเช่น เซมัง โอรังอัสลี ดนัง เงาะป่า และซาไก ทุกชื่อล้วนบ่งบอกถึงลักษณะทางกายภาพและสังคมที่แตกต่างจากคนทั่วไป เช่น ที่เรียกว่าเงาะป่า เพราะซาไกมีผมหยิกลักษณะใกล้เคียงกับเปลือกเงาะ และยังอาศัยอยู่ในป่าอีกด้วย ลักษณะทางชาติพันธุ์ของซาไกนั้นมีนักวิชาการหลายท่านแสดงความเห็นไว้แตกต่างกันออกไปหลายแง่มุม เช่น องอาจ รุ่งจันทร์ฉาย (2526) กล่าวว่าซาไกเป็นชนชาติเชื้อสายนิกริโต ตระกูลออสโตร-เอเชียติก (Austro-Asiatic) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เผ่าหนึ่ง เป็นชนพื้นเมืองรุ่นแรกสุดที่นักมานุษยวิทยาเชื่อได้ว่าอพยพจากอินเดียสมัยดึกดำบรรพ์เข้ามาอยู่ในแหลมมลายู แต่หลังจากชาวมลายูได้อพยพเข้ามาในแหลมมลายูมากขึ้นก็ได้รุกรานชนพื้นเมืองกลุ่มนี้และครอบงำให้อยู่ภายใต้การปกครองของตนและเรียกพวกเขาว่า “ซาไก” ซึ่งหมายถึง ไพร่ คนใต้ปกครอง หรือผู้ไร้วัฒนธรรม

Professer C.S. Coon (อ้างถึงในสุรินทร์ ภู่ขจรและคณะ, 2534) จัดพวกซาไกว่าเป็นกลุ่มชาติพันธุ์โอเชียนนิกรอยด์ และ Brandt (1965) กล่าวว่าซาไกมีเชื้อสายของนิกริโตซึ่งเป็นเผ่าพันธุ์ที่มีอยู่กระจัดกระจายตามพื้นที่ต่างๆในทวีปเอเชีย ในแนวคิดของ Brandt แบ่งนิกริโตออกเป็น 2 พวก คือ

1) พวก African Negroid ซึ่งเป็นนิกริโตที่อาศัยอยู่ในแถบทวีปอัฟริกา

2) พวก Oceanic Negroid เป็นนิกริโตลูกผสม ระหว่างพวกมองโกลอยด์ (Mongoloid) ออสตราลอยด์ (Australoid) และนิกรอยด์ (Negroid) แต่ยังคงลักษณะทางกายภาพ พฤติกรรมในการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกับพวกนิกรอยด์ เผ่าพันธุ์ที่เขาเชื่อว่าเป็น Oceanic Negroid นี้คือประชาชนของอาณาจักรฟูนันในประเทศจีน พวก Cuci และพวก EUO ที่อาศัยตามภูเขา Quang-binh ในประเทศเวียตนาม

ซาไกในประเทศไทยจะมีผมหยิกเหมือนนิกริโตนอกจากนี้ยังมีหลักฐานทางโบราณคดีเกี่ยวกับนิกริโตที่นักมานุษยวิทยาชาวดัชท์ชื่อ Rodneg Need Ham ขุดพบโครงกระดูกบนเกาะ Flores ในประเทศอินโดนีเซียในปี ค.ศ. 1955 ซึ่งมีลักษณะบ่งบอก

ได้ว่าเป็นฟอสซิลของนิกริโตมีอายุประมาณ 30,000-40,000 ปีพระยาอนุมานราชธน, ชิน อยู่ดี และบราเธอร์ อมาโด (อ้างถึงใน สุรินทร์ ภู่ขจรและคณะ, 2534) มีความเห็นทำนองเดียวกันว่าซาไกเป็นพวก "นิกริโต" ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของเชื้อชาติใหญ่ที่เรียกว่านิกรอยด์ หนังสือสารานุกรมภาคใต้กล่าวถึงซาไกว่าเป็นเชื้อสายของชนเผ่าเวดดาบนเกาะลังกาที่อพยพเข้ามา และมีแนวความคิดบางแนวยึดถือว่า ซาไกมีเชื้อสายมอญ-เขมร (Mon-Khmer) หรือไม่ก็เป็นเชื้อสายเดียวกับชาวเขาในมณฑลยูนนานในประเทศจีน (สถาบันทักษิณคดี, 2529) ในหัวข้อชุมชนก่อนประวัติศาสตร์ในภาคใต้ หนังสือสารานุกรมภาคใต้ กล่าวว่าในสมัยไพลโตซีนไม่น้อยกว่า 11,000 ปีมาแล้วออสตราลอยด์พวกหนึ่ง คือนิกริโตซึ่งเป็นพวกเดียวกับเงาะที่ยังหลงเหลืออยู่ทางภาคใต้ของไทยแถบจังหวัดพัทลุง ตรัง ได้เคลื่อนย้ายเข้ามาตั้งถิ่นฐานบนที่ราบชายฝั่ง แต่ต่อมาถูกผู้คนที่อพยพเข้ามาภายหลังผลักดันให้เคลื่อนย้ายเข้าไปอยู่ตามพื้นที่ป่า (สถาบันทักษิณคดี, 2529)

แหล่งที่อยู่อาศัยของซาไกในประเทศไทยนั้นกระจัดกระจายอยู่บริเวณภาคใต้ของไทย แหล่งที่อยู่ของซาไกนั้นสามารถสืบย้อนหลังลงไปได้ประมาณ 25 ปี ชนกลุ่มนี้มักอาศัยอยู่ตามแถบเทือกเขาบรรทัดในเขตจังหวัดตรัง สตูล พัทลุง และในแถบจังหวัดยะลา ปัตตานี และนราธิวาส เมื่อปี พ.ศ. 2520 ได้มีผู้พบเห็นซาไกในแถบจังหวัดสตูลที่อำเภอทุ่งหว้า ในแถบจังหวัดยะลาที่อำเภอธารโต อำเภอมันนังสตา และอำเภอเบตง ในบริเวณชายแดนไทย-มาเลเซีย (รูปที่ 1.1) และในช่วงปีพ.ศ. 2520 นี้เองทางรัฐบาลทำการปราบปรามผู้ก่อการร้าย ผ.ก.ค.ในแถบจังหวัดทางภาคใต้ มีความเข้าใจผิดคิดว่าซาไกที่ก่อไฟย่างเนื้อเป็นพวก ผ.ก.ค. ทางรัฐบาลจึงทำการโจมตีทางอากาศ ทำให้ซาไกล้มตายเป็นจำนวนมาก ซาไกที่อยู่ในเขตจังหวัดพัทลุงต่างก็อพยพไปอยู่ถิ่นที่ไม่มีการสู้รบกัน ซาไกที่อยู่ในเขตจังหวัดพัทลุง ตรัง จะอพยพไปอยู่แถบอำเภอทุ่งหว้า จังหวัดสตูล และยะลา และมีบางพวกหลบหนีเข้าไปในประเทศมาเลเซีย (องอาจ รุ่งจันทร์ฉาย, 2526) จากหนังสือซาไกเจ้าขุนเขาและสมุนไพร (ไพบูลย์ ดวงจันทร์, 2532) กล่าวว่าซาไกที่กระจายอยู่ในแถบจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทยเท่าที่มีคนพบเห็นมีประมาณ 200 คน แต่อย่างไรก็ตามการคาดคะเนจำนวนประชากรซาไกนั้นอาจคลาดเคลื่อนได้เพราะซาไกเป็นกลุ่มที่มีการอพยพโยกย้ายที่อยู่เป็นประจำ ซึ่งเป็นไปตามความเชื่อสมัยโบราณ คือ

เมื่อมีคนตายชาไกจะย้ายทันทีหรือเมื่อแหล่งอาหารในบริเวณที่พักหมดความอุดมสมบูรณ์ (สุรินทร์ ภู่ขจรและคณะ, 2534) อีกทั้งเป็นพวกที่ไม่ชอบพบปะผู้คนภายนอก มักหลบเลี่ยงการพบปะกับคนที่แปลกหน้า กลุ่มชาไกที่ศึกษาในครั้งนี้อยู่ในเขตอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง (รูปที่ 1.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.1 แผนที่ภาคใต้ของประเทศไทย แสดงที่ตั้งอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง และจังหวัดอื่น ๆที่มีซาไกอาศัยอยู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1

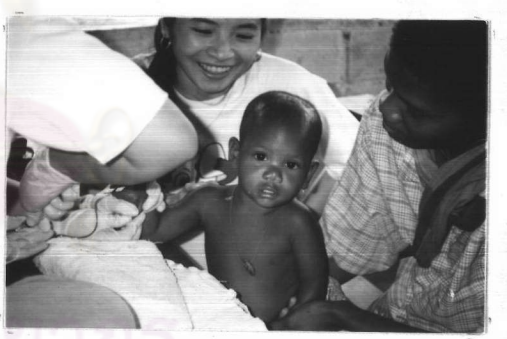
2

3

4

5

6



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.2 กลุ่มชนเผ่าซาไก อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง

1> ทางเข้าหมู่บ้านซาไก อ.ปะเหลียน จ.ตรัง

2> ชนเผ่าซาไก

3,4> ครอบครัวซาไก (3> ชายไทยแต่งงานกับหญิงซาไก)

5,6> การเก็บตัวอย่างเลือดจากชนเผ่าซาไก

สำหรับภาษาของชาไกนั้นพระยาอนุมานราชธน, สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์และ John H. Brandt มีความเห็นตรงกันว่า ภาษาชาไกมีต้นตระกูลมาจากภาษามอญ-เขมร หรือบางทีอาจเรียกว่าภาษาในกลุ่มออสโตร-เอเชียติก (สถาบันทักษิณคดี, 2529)

ชาวชอง (Chong tribe)

ในปี ค.ศ. 1935 Seidenfaden (อ้างถึงใน สุเรขา สุพรรณไพบูลย์, 2530) ได้ค้นคว้าเกี่ยวกับชนชาติต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย และได้เสนอรายงานไว้ในวารสารสยามสมาคมว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยสามารถแบ่งกลุ่มโดยอาศัยเผ่าพันธุ์ได้ 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) กลุ่มชนเผ่านิกรอยด์ ซึ่งได้แก่พวก เซมัง ปิกมี่ (Semang, Pigmies) ชนกลุ่มนี้อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของประเทศไทยซึ่งมีเขตแดนติดต่อกับแหลมมลายู 2) กลุ่มชนเผ่าออสโตร-เอเชียติก ชนกลุ่มนี้จะจัดอยู่ในเชื้อชาติมอญ-เขมรซึ่งมีชาวชอง ละว้า และอื่นๆ 3) กลุ่มชนเผ่ามองโกลอยด์ ซึ่งได้แก่ คนไทย และคนจีนที่อพยพเข้ามาอยู่ในไทย

สุเรขา สุพรรณไพบูลย์ (2530) ได้ทำการวิจัยและค้นคว้า ซึ่งแสดงประวัติความเป็นมาและการจัดแบ่งเผ่าพันธุ์ของชาวชองไว้ดังนี้จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์และจากการค้นคว้าของนักมานุษยวิทยาสรุปได้ว่าชาวชองเป็นชาวป่ากลุ่มหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มชาติพันธุ์ออสโตร-เอเชียติก ตระกูลมอญ-เขมร จากลักษณะความเป็นอยู่ อาชีพ สังคม และวัฒนธรรมดั้งเดิม ชาวชองมีลักษณะเป็นชาวป่ามากซึ่งลักษณะเช่นนี้คล้ายกับพวกชาวบน กูย หรือส่วย ซึ่งเป็นชนกลุ่มมอญ-เขมร นอกจากนี้รูปร่างลักษณะโครงสร้างของร่างกายแตกต่างไปจากพวกคนไทย คนจีน ซึ่งอยู่ในเผ่ามองโกลอยด์ ชาวชองมีวัฒนธรรมเป็นของตัวเองโดยเฉพาะอย่างยิ่ง “ภาษาชอง” ซึ่งมีแต่ภาษาพูด ไม่มีภาษาเขียนและนอกจากนี้ประเพณีบางอย่างของชาวชองได้มีการปฏิบัติสืบต่อกันมาจนทุกวันนี้โดยไม่ถูกประเพณีของชนชาติอื่นกลืน หรือเลือนหายไป เช่น ประเพณีการแต่งงานลูก

สาวคนโต ประเพณีการเล่นผีหิ้ง เป็นต้น ชาวซองมีถิ่นฐานดั้งเดิมอาศัยอยู่ตามป่าเขาและที่ราบที่เป็นป่าระหว่างหุบเขาในภาคตะวันออกของประเทศไทย คือในท้องถิ่นจังหวัดระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และเลยเข้าไปในประเทศสาธารณรัฐกัมพูชา ซึ่งมีเขตแดนติดต่อกับจังหวัดดังกล่าวข้างต้นของประเทศไทย

ชาวซองจะอาศัยอยู่ในดินแดนแถบนี้ตั้งแต่เมื่อใดไม่ปรากฏหลักฐานที่แน่ชัด ได้มีผู้สันนิษฐานว่าชาวซองคงจะตั้งถิ่นฐานบ้านเรือนอยู่ตามท้องที่ในแถบนี้มาก่อน เพิ่งจะถอยร่นเข้าป่าเข้าดงไปเมื่อไทยมีอำนาจครอบครองเมืองจันทบุรีในสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี (ตรี อมาตยกุล, 2500) และหลักฐานที่เชื่อถือได้ที่แสดงว่าชาวซองอาศัยอยู่ในดินแดนภาคตะวันออกนี้คือ นิราศเมืองแกลงซึ่งได้กล่าวถึงชาวซองของสุนทรภู่ และเชื่อว่าสุนทรภู่แต่งไว้เมื่อปี พ.ศ. 2350 (กรมศิลปากร, 2520) และในปัจจุบันท้องที่จังหวัดจันทบุรี มีชาวซองอาศัยอยู่มากที่สุด โดยเฉพาะในเขตอำเภอมะขามและอำเภอโป่งน้ำร้อน (รูปที่ 1.3) (Webber, 1976) จากการศึกษาค้นคว้าเชื่อว่าชาวซองมิได้อพยพโยกย้ายถิ่นฐานมาจากที่ไหน แต่ได้อาศัยอยู่ในถิ่นฐานภูมิภาคนี้มาแต่ดั้งเดิม (สุเรขา สุพรรณไพบูลย์, 2530)

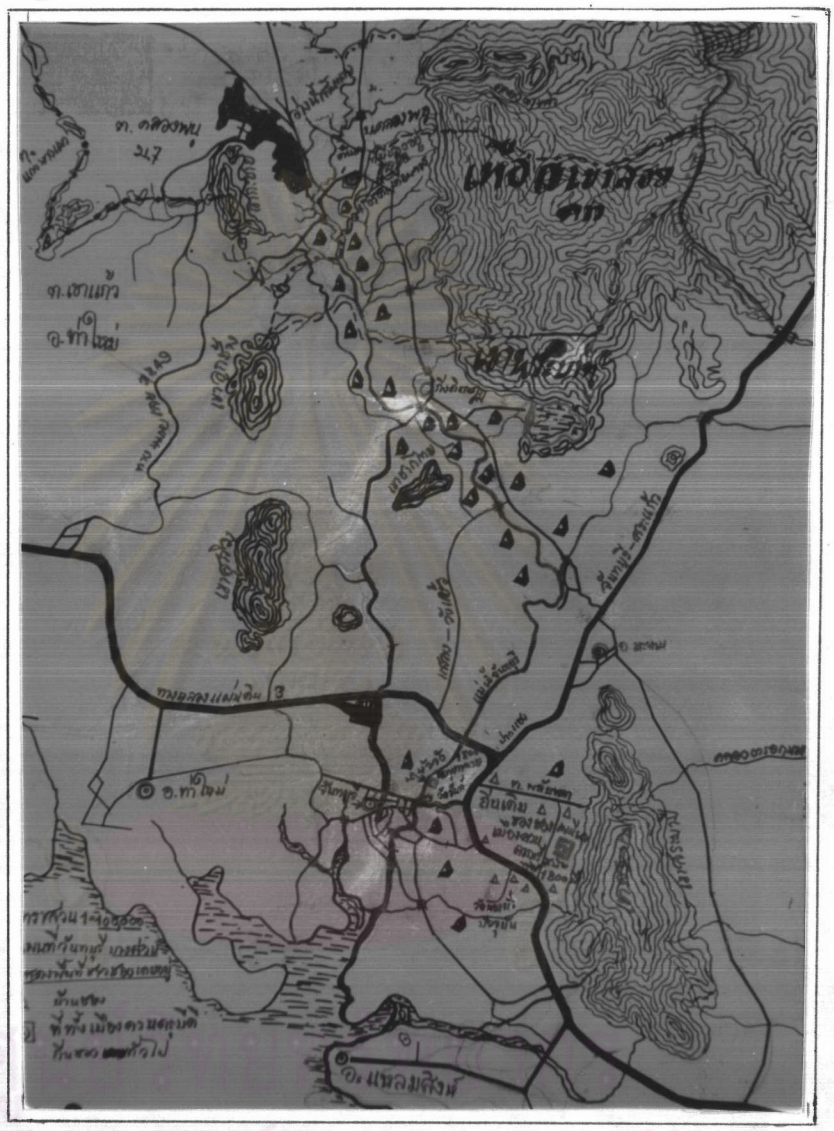
สิริกาญจน์ เจริญธรรม (2530) ศึกษาเรื่อง "ภาษาซอง" และได้กล่าวถึงชาวซองไว้ว่า ยังไม่มีหลักฐานใด ๆ พอที่จะยืนยันได้ว่าพวกซองเป็นชนที่อพยพมาจากที่ใดนอกจากสันนิษฐานเอาจากรูปร่างลักษณะและชีวิตความเป็นอยู่เพราะว่ารูปร่างลักษณะทั่ว ๆ ไปของชาวซองมีขนาดค่อนข้างเล็ก คือเล็กกว่าคนไทยเล็กน้อย มีผิวสีดำกว่าคนไทยในลักษณะดำแดง ไม่ดำสนิทหรือดำอย่างนิลเหมือนคนเขมร ลักษณะเส้นผมหยิกขอดติดหนังศีรษะ ใบหน้ารูปสี่เหลี่ยม คางเหลี่ยม ขากรรไกรกว้าง จมูกแบนใหญ่ไม่โด่ง ปากหนา ตาโปนใหญ่

รูปที่ 1.3 จังหวัดจันทบุรี แสดงที่ตั้ง ต.คลองพลู อ.มะขาม จ.จันทบุรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตามตำราพงศาวดารจังหวัดจันทบุรีเมื่อ พ.ศ. 900-1800 จันทบุรีตั้งอยู่เชิงเขาสระบาปนามว่าเมืองควนคราบุรี (รูปที่ 1.4) ชาวพื้นเมืองทั่วไปเป็นชาวซองสนทนาเป็นภาษาถิ่นของตนเอง ต่อมาในปี พ.ศ. 1900-2000 ย้ายเมืองมาตั้งที่บ้านหัววังอยู่เหนือวัดจันท์แต่ในช่วงปีพ.ศ. 1973 พระเจ้าอู่ทองสถาปนาเมืองกรุงศรีอยุธยาซึ่งเมืองจันทบุรีก็เป็นเมืองขึ้นของกรุงศรีอยุธยาเหมือนกัน ต่อมาเมื่อ พ.ศ. 2310 กรุงศรีอยุธยาถูกข้าศึกตีแตกเป็นครั้งที่ 2 พระเจ้าตากสินมหาราชได้ยกทัพมาตีเมืองจันทบุรีแตกเพื่อรวบรวมกำลังสู้กับพม่าจนได้รับชัยชนะ นับแต่นั้นมาชาวพื้นเมืองซองจึงพากันหนีอพยพไปทำมาหากินอยู่ในเขตอำเภอมะขาม ส่วนใหญ่ไปตั้งอยู่ตามลุ่มแม่น้ำจันทบุรีคือ ตั้งแต่หมู่บ้านพญาบน แตงเม วังแซ้ม ขนุน ทุ่งสะพาน พลวง กระทิงดินแดง ทุ่งตาอิน ลำพัง พังแลง ตะเคียนทอง น้ำขุ่น และตำบลคลองพลูดังกล่าว หมู่บ้านเหล่านี้เมื่อประมาณร้อยปีเศษคงพูดภาษาซองทั้งนั้น และปัจจุบันยังรักษาภาษาซอง และรักษาประเพณีซองอยู่เพียงสองตำบลเท่านั้นคือ ตำบลคลองพลู และตำบลตะเคียนทองบางส่วน (เฉิน ผันผาย, 2537) ซึ่งชาวซองที่ศึกษาในครั้งนี้อยู่ในตำบลคลองพลู อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี (รูปที่ 1.5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

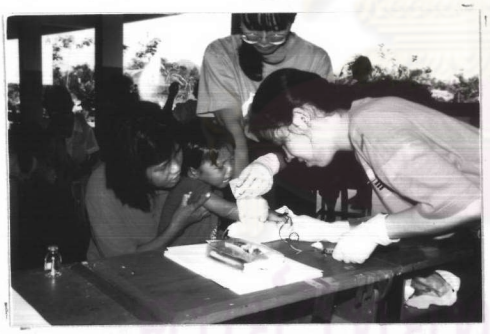


รูปที่ 1.4 จันทบุรีบางส่วน แสดงพื้นที่ที่ชาวซองเคยอาศัยอยู่ (เฉิน ผันผาย, 2537)

1

3

4



5

รูปที่ 1.5 ชาวซองตำบลคลองพลู อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี

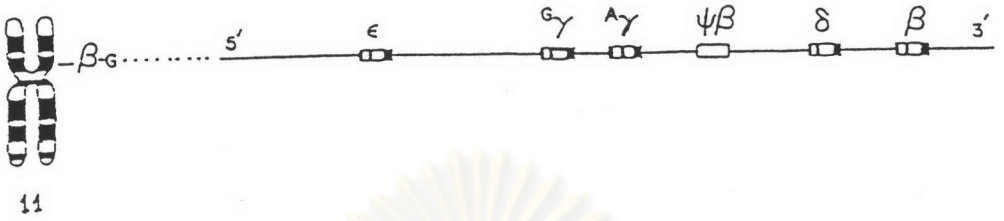
1> ชาวซอง

2> ครอบครัวชาวซอง

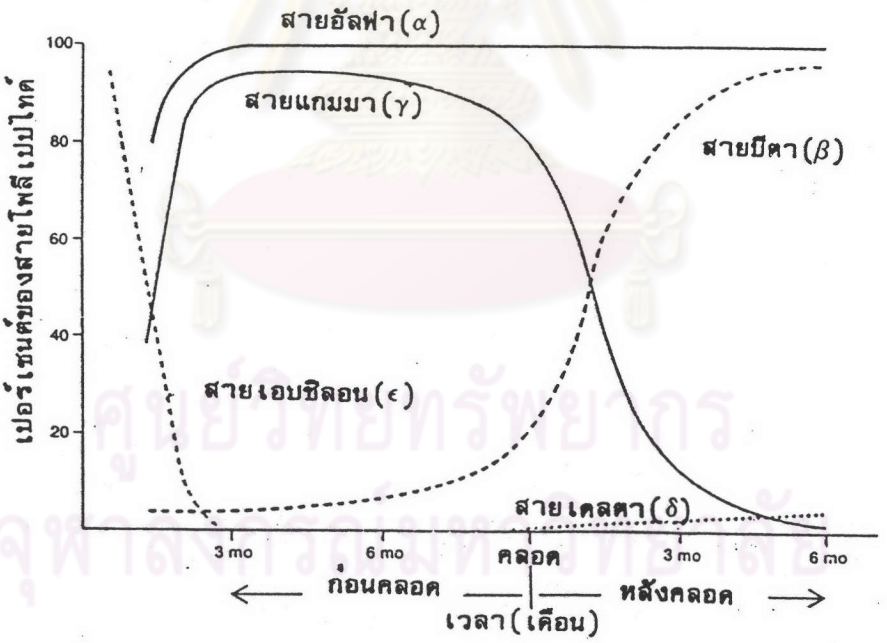
3> ลักษณะชายชาวซอง

4,5> การเก็บตัวอย่างเลือดในชาวซอง

กลุ่มยีนบีตา-โกลบิน (β-globin gene cluster)



รูปที่ 1.6 แสดงกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 ประกอบด้วยยีน ε, Gγ, Aγ, ψβ, δ และ β-globin เรียงตามทิศ 5'-->3', β-G หมายถึง β-globin gene



รูปที่ 1.7 กราฟแสดงการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ชนิดต่าง ๆของโมเลกุลฮีโมโกลบิน ตามระยะการเจริญเติบโตของมนุษย์

กลุ่มยีนบีตา-โกลบินตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 (รูปที่ 1.6) ซึ่งกินเนื้อที่ประมาณ 65 kb ในกลุ่มนี้มียีนที่ทำหน้าที่ได้ตามปกติอยู่ 5 ชนิด คือ embryonic globin gene (ε), fetal globin genes (Gγ และ Aγ), delta globin gene (δ) และ beta globin gene (β) สำหรับ pseudobeta globin gene (ψβ) เป็นยีนที่มีโครงสร้างเหมือนยีนบีตา-โกลบินแต่ไม่ทำหน้าที่แล้ว แต่ละยีนจะเริ่มและหยุดการทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ตามระยะการเจริญเติบโต (รูปที่ 1.7) คือระยะที่เป็นตัวอ่อน (embryo) จะได้สายโกลบินจาก ε-globin gene และระยะที่เป็นทารก (fetus) จะได้สายโกลบินจาก fetal globin gene แต่เมื่ออายุ 1 ปีขึ้นไปฮีโมโกลบินจะประกอบด้วยสายบีตา-โกลบินเป็นส่วนใหญ่ โดยมีสายเดลตา-โกลบิน และสายฟีทัล-โกลบินเพียงเล็กน้อย (Collins และ Weissman, 1984) ซึ่งยีนแต่ละตัวในกลุ่มนี้ได้รับการโคลนและหาลำดับของนิวคลีโอไทด์เบสไว้หมดแล้ว ข้อมูลพื้นฐานนี้เองที่ให้ประโยชน์อย่างมากในการศึกษาควบคุมการแสดงออกของยีน การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน ตลอดจนการศึกษามิวเตชั่น และโพลีมอร์ฟิสม ที่เกิดขึ้นในยีนแต่ละชนิด (สุพรรณ ฟู่เจริญ และกุลนภา ฟู่เจริญ, 2534)

การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (hemoglobin electrophoresis) (Word, 1983)

ฮีโมโกลบินมีหลายชนิด แต่ละชนิดแตกต่างกันที่ส่วนของโปรตีน คือสายโกลบิน ซึ่งใน 1 โมเลกุลของฮีโมโกลบินจะมีอยู่ 4 สาย โดยที่ 2 สายเป็นสายอัลฟ่า-โกลบิน ส่วนอีก 2 สายจะเป็นสายบีตา-โกลบิน สายแกมมา-โกลบิน หรือสายเดลตา-โกลบินสายโกลบินเหล่านี้ ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ สายอัลฟา-โกลบินมีกรดอะมิโนจำนวน 141 ตัว สายบีตา-โกลบิน สายแกมมา-โกลบิน และสายเดลตา-โกลบินมีกรดอะมิโนจำนวน 146 ตัว กรดอะมิโนเหล่านี้มีประจุต่างกันเป็นผล

ให้ประจุสุทธิของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดแตกต่างกัน คุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้แยกชนิดของฮีโมโกลบินได้ โดยทั่วไปนิยมให้ฮีโมโกลบินวิ่งเข้าไปในสนามไฟฟ้าที่มีพีเอชมากกว่าพีไอของฮีโมโกลบิน ซึ่งจะทำให้ฮีโมโกลบินทุกชนิดมีประจุสุทธิเป็นลบ จึงวิ่งเข้าหาขั้วบวก ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะวิ่งไปได้ไกลเพียงใดนั้นขึ้นกับประจุสุทธิของฮีโมโกลบินชนิดนั้น ๆ ทำให้สามารถแยกฮีโมโกลบินแต่ละชนิดออกจากกันได้ ปัจจุบันวิธีที่นิยมแยกชนิดของฮีโมโกลบินมี 2 วิธี ซึ่งแตกต่างกันที่ตัวกลางที่ใช้ในการแยกชนิดของฮีโมโกลบิน คือ

- starch gel electrophoresis
- cellulose acetate electrophoresis

แต่สำหรับการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินในชนเผ่าซาไกและชาวชองครั้งนี้ใช้วิธี cellulose acetate electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้อย่างสะดวกและรวดเร็วกว่าวิธี starch gel electrophoresis โดยใช้แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท (cellulose acetate strip) เป็นตัวกลางในการแยกชนิดของฮีโมโกลบินซึ่งทำให้สามารถหาปริมาณของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดได้ด้วย

<u>หมายเหตุ</u>

1. การแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีนี้ มีข้อเสียคือ แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท มีราคาแพงในกรณีที่จำนวนตัวอย่างน้อยอาจตัดแบ่งแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทได้และเนื่องจากวิธีนี้ใช้น้ำละลายฮีโมโกลบินปริมาณน้อย อาจทำให้ตรวจไม่พบฮีโมโกลบินที่มีปริมาณน้อยได้ เช่น ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สพริง (Hb CS) เป็นต้น

2. การย้อมแถบฮีโมโกลบินบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทด้วยสี ponceau S จะติดสีโปรตีนชนิดอื่นด้วยได้แก่แถบของเอนไซม์ carbonic anhydrase ซึ่งเห็นเป็นแถบ 2 แถบอยู่ระหว่างจุดที่หยดน้ำละลายฮีโมโกลบิน (origin) กับแถบของ HbA_2 ทำให้เข้าใจผิดว่าเป็น ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สพริง

การตรวจวัดปริมาณ HbA_2 และ HbE โดยวิธีไมโครคอลัมน์ โครมาโตกราฟี
(ณัฐยา แซ่อึ้ง, 2535)

ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ที่มีจำนวนประจุต่างกันสามารถจะแยกออกจากกันโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) โดยมีไดเอทิลอะมิโนเอทิลเซลลูโลส (diethylaminoethyl cellulose; DEAE-cellulose) ซึ่งมีประจุเป็นบวกเป็นตัวกลางจับกับฮีโมโกลบินซึ่งมีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอชมากกว่าพีไอ HbA_2 และ HbE ซึ่งมีประจุที่เป็นลบเท่ากัน แต่น้อยกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่น ๆ จะถูกพาออกมาก่อนด้วยสารละลายที่มีคลอไรด์อิออน (Cl^-) ความเข้มข้นต่ำๆ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลอไรด์อิออน ฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆก็จะถูกพาออกมาโดยคลอไรด์อิออนจะเข้าไปจับกับ DEAE-cellulose แทนฮีโมโกลบิน

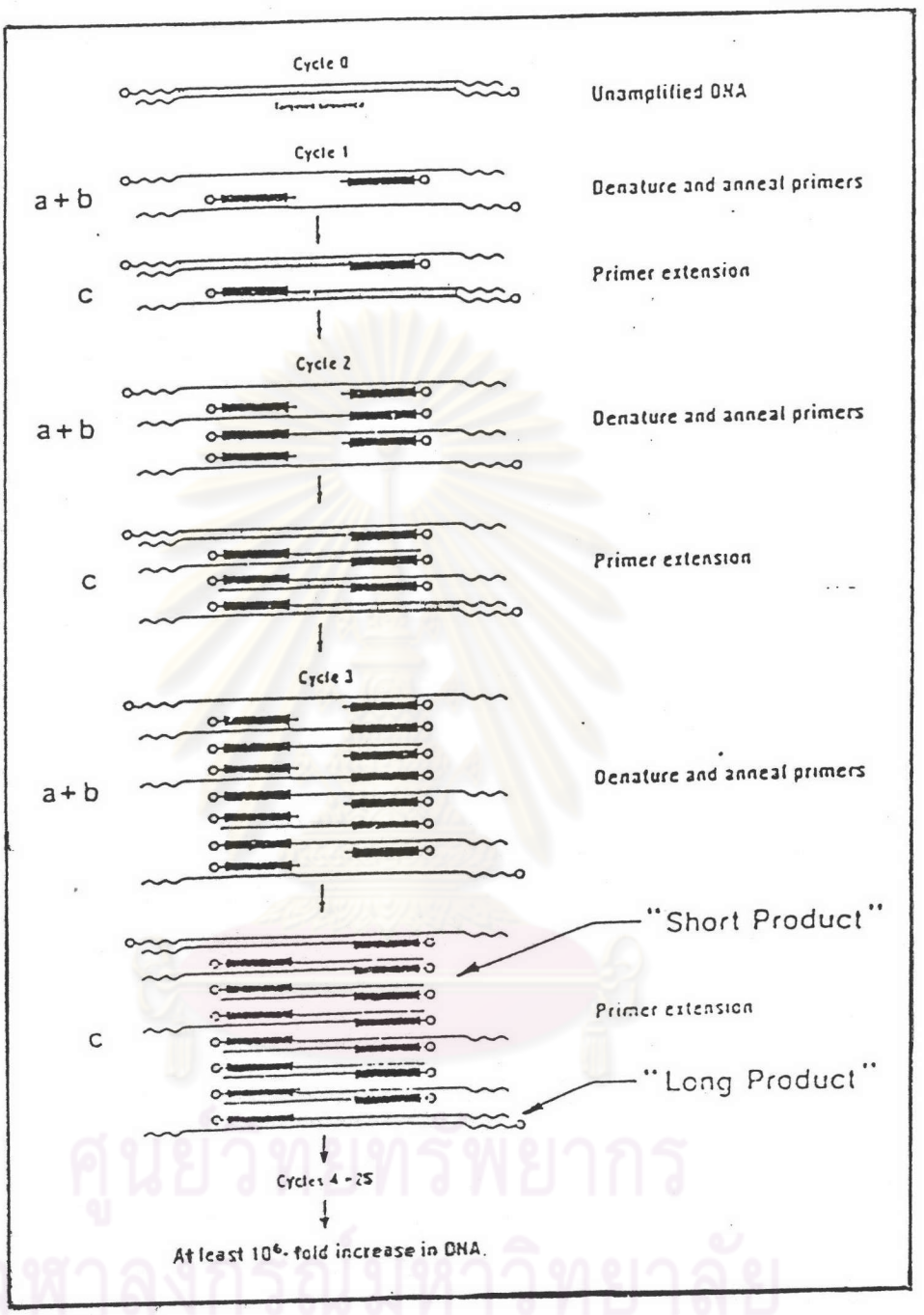
เทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (Polymerase Chain Reaction ; PCR)
(Saiki และคณะ, 1985)

พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลองโดยอาศัยไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิดที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ขนาดสั้น ๆ โดยทั่วไปจะมีความยาวประมาณ 20-30 เบส และถูกสร้างขึ้นมาเพื่อให้มีลำดับของเบสที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวคนละสายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาโดยไพรเมอร์จะมีทิศทางตรงข้าม (รูปที่ 1.8)

ปฏิกริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. denaturation คือขั้นตอนการทำให้คู่ของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่จะศึกษา แยกเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 95 ^{o}C

2. annealing คือขั้นตอนการจับกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับไพรเมอร์ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน (complementary) จะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิถูกลดต่ำลงมา



รูปที่ 1.8 แสดงหลักการของโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น

3. primer extension คือขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา โดยอาศัยดีเอ็นเอสายเดี่ยวเริ่มต้นทั้ง 2 สายเป็นแม่พิมพ์ (template) สร้างต่อออกไปจากไพรเมอร์ โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotide triphosphate) ครบทั้ง 4 ชนิด [dGTP, dATP, dCTP, dTTP] เป็นซับสเตรท (substrate)

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่ 3 จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงส่วนที่ต้องการศึกษาเพิ่มขึ้นมา 2 ชุดจากเดิมเพียง 1 ชุดทั้ง 2 ชุดนี้ก็จะกลายเป็นแม่พิมพ์สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในรอบต่อไปเมื่อทำการสังเคราะห์ต่อไปเป็นจำนวน n รอบ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาก็จะเพิ่มเป็น 2^n จากหลักการดังกล่าวนี้จึงสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ศึกษายีนที่มีเพียง 1 ชุด (single copy gene) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในทางปฏิบัติ ปฏิกริยาต่าง ๆ เหล่านี้จะเกิดขึ้นในหลอดทดลองขนาดเล็ก (ความจุประมาณ 0.5 ml.) เพียงหลอดเดียว ซึ่งภายในบรรจุส่วนผสมที่จำเป็นสำหรับการทำงานของเอ็นไซม์ เช่น ดีเอ็นเอเริ่มต้น dNTP ไพรเมอร์ Mg^{2+} สารละลายบัฟเฟอร์ และเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเดิมใช้ Klenow fragment DNA polymerase จาก *Escherichia coli* ซึ่งต่อมาก็พัฒนามาใช้ DNA polymerase จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* และรู้จักกันทั่วไปว่า *Taq* DNA polymerase ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง

ยีน HbE และเทคนิคเอเอสพีซีอาร์ (Allele Specific Polymerase Chain Reaction ; (ASPCR)

ฮีโมโกลบินอี (HbE) เกิดจากความผิดปกติของยีนบีตา-โกลบินที่ลำดับของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 เดิมมีรหัสเป็น GAG ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนชนิดกลูตามิก (glutamic acid) เปลี่ยนไปเป็น AAG ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนชนิดไลซีน (lysine) ($\alpha_2\beta_2^{26\ Glu-->Lys:\ GAG-->AAG}$) เป็นผลทำให้เกิดฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร ซึ่งนอกจากจะทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโกลบินผิดปกติแล้ว มิวเตชั่นดังกล่าวยังส่งผลให้เกิด abnormal

splicing ขึ้นในยีนอีกด้วย ทำให้ยีนนี้สังเคราะห์สายโกลบินได้น้อยลง (Orkin และคณะ, 1982) ผู้ที่มียีน HbE ทั้งในภาวะเฮเทอโรไซโกต (heterozygote,EA) และโฮโมไซโกต (homozygote,EE) จะไม่แสดงอาการโลหิตจางแต่ขนาดของเม็ดเลือดแดงเล็กกว่าคนปกติ แต่ความผิดปกติไม่มากเท่ากับผู้เป็นโรคธาลัสซีเมียในรายที่มียีน HbE ร่วมกับบีตา-ธาลัสซีเมียจะพบความรุนแรงของโรคคล้ายผู้ที่เป็นบีตา-ธาลัสซีเมียโฮโมไซโกตโดยมีฮีโมโกลบินเป็นชนิด EE และมี HbE อยู่ตั้งแต่ร้อยละ 40-90 ซึ่งส่วนใหญ่มีค่าอยู่ร้อยละ 50-60 (Wasi, 1981)

จากการสำรวจพบว่า HbE มีอุบัติการณ์สูงในแถบบริเวณรอยต่อระหว่างไทย ลาว และกัมพูชา ซึ่งถูกเรียกว่า "HbE triangle" (Na-nakorn และ Wasi, 1978) ในประเทศไทยพบมากในภาคอีสาน ซึ่งในบางจังหวัดเช่น สุรินทร์ พบได้สูงถึงร้อยละ 50 ของประชากร (ตารางที่ 1.1) และพบได้สูงมากในชนเผ่าภูไทย และโส้ที่สกลนคร (Sriboonlue และคณะ, 1985) แต่ไม่พบในชาวเขา เผ่าแม้ว ลีซอ มูเซอ อีก้อ และกระเหรี่ยง (ประเวศ วะสี, 2534)

ในการตรวจวินิจฉัยผู้ที่มี HbE ทำได้โดยการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Word, 1983) ซึ่งเป็นการอาศัยคุณสมบัติการมีประจุสุทธิของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดต่างกัน HbE จะเคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ HbA_2 โดยในรายที่เป็นเฮเทอโรไซโกตจะมีปริมาณ HbE ระหว่างร้อยละ 25-30 แต่ในรายที่พบร่วมกับบีตา-ธาลัสซีเมียจะมีค่า HbE ที่ต่ำลงนอกจากนี้ฮีโมโกลบินที่วิ่งได้ในระยะทางที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันเช่น HbA_2 , ฮีโมโกลบินซี (HbC) และฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สพริง หรือในภาวะที่มี HbA_2 เพิ่มขึ้นเช่น ในบีตา-ธาลัสซีเมีย เทรต (β-thalassemia trait) อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัย HbE ได้

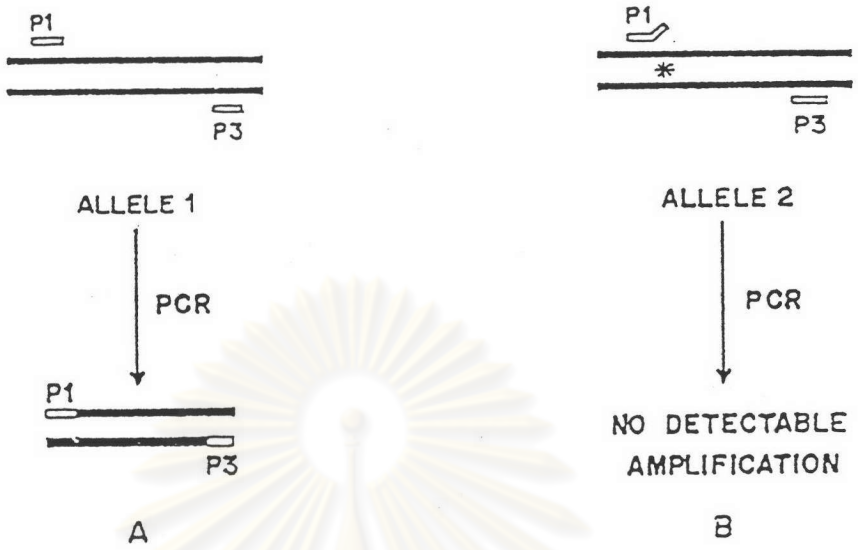
ปัจจุบันมีผู้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์จนสามารถตรวจหาความผิดปกติของยีนอัลฟ่าคอนสแตน สพริง (Fucharoen , Fucharoen และ Fukumaki, 1990) และยีน HbE (Fucharoen, Fucharoen และ Fukumaki, 1994) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหายีนที่มีความผิดปกตินั้นโดยตรง วิธีนี้ให้ผลถูกต้องแม่นยำเช่นเดียวกันกับการตรวจสอบด้วยการใช้สารกัมมันตภาพรังสี

ตารางที่ 1.1 แสดงค่าเปรียบเทียบจำนวนร้อยละของผู้ที่มี HbE ที่สำรวจในประชากรไทยแหล่งต่าง ๆ

ประชากร	จำนวนที่ศึกษา	ร้อยละของผู้ที่มี HbE	ผู้ศึกษา
ไทย			
อุบลราชธานี	565	44.6	Wasi และคณะ (1967)
ขอนแก่น	150	43.3	Wasi และคณะ (1967)
อุดรธานี	315	36.8	Wasi และคณะ (1967)
ร้อยเอ็ด	760	34.02	พรรณี ชิโนรักษ์และคณะ (2532)
หนองคาย	517	30.94	พรรณี ชิโนรักษ์และคณะ (2533)
บุรีรัมย์	249	42.97	พรรณี ชิโนรักษ์และคณะ (2534)
สุรินทร์	-	53	อ้างตาม Na-Nakhorn และ Wasi (1978)
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	49	32.7	Na-Nakhorn และคณะ (1956)
ภาคตะวันออกเฉียงใต้	48	18.7	Na-Nakhorn และคณะ (1956)
ภาคใต้	126	12.7	Na-Nakhorn และคณะ (1956)
ภาคเหนือ	99	8.0	Wasi และคณะ (1967)
ภาคกลาง	554	13.3	Wasi และคณะ (1967)
ไทยอีสาน	38	26.3	นเรศร์ มุลาลีและคณะ (2525)
ไทยดำ	132	20.5	นเรศร์ มุลาลีและคณะ (2525)
เขมร			
กำปงธม	-	6-9	อ้างตาม Na-Nakhorn และ Wasi (1978)
สตรังเตรง	-	44-61	อ้างตาม Na-Nakhorn และ Wasi (1978)

การศึกษาด้วยวิธี ASPCR นี้ต้องทราบชนิดของมิวเตชั่นก่อนและอาศัยไพรเมอร์จำเพาะที่สร้างขึ้นมา โดยสร้างให้มีความจำเพาะต่อมิวเตชั่นนั้นๆ โดยให้มีตำแหน่งของเบสที่ต่างไปจากลำดับของเบสปกติที่ปลายด้าน 3′ ของไพรเมอร์ (allele specific primer) และใช้เป็นไพรเมอร์เริ่มต้น คู่กับไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งที่มีลำดับเบสตามปกติ (common primer) ในปฏิกริยาของพีซีอาร์ เมื่อไพรเมอร์จำเพาะนี้ไปจับกับดีเอ็นเอของคนปกติจะจับได้ไม่สมบูรณ์ ปลายด้าน 3′ ของไพรเมอร์จะเปิดอ้าออกทำให้ไม่สามารถเป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เนื่องจาก *Taq* polymerase ขาดฤทธิ์ของ 3′-5′ exonuclease ทำให้ไม่สามารถแก้ไขความไม่สมบูรณ์นี้ได้ (รูปที่ 1.9) ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับของเบสที่ปกติ จะนำไปขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากยีนของผู้ป่วยไม่ได้ เมื่อนำดีเอ็นเอนี้ไปตรวจสอบโดยการทำอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟเรซีส (agarose gel electrophoresis) ก็จะทราบทันทีว่าในตัวอย่างนั้นมีมิวเตชั่นชนิดนั้นๆอยู่หรือไม่ วิธีนี้มีข้อดีที่ตรวจพบความผิดปกติของยีนเลยด้วยการทำอิเลคโตรโฟเรซีสง่าย ๆ ได้ผลรวดเร็วและไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.9 ไดอะแกรมแสดงหลักการของ ASPCR, allele1 เป็นอัลลีลปกติ ส่วน allele2 มีมิวเตชั่นตรงตำแหน่งที่มีเครื่องหมาย*, P1 เป็นไพรเมอร์จำเพาะต่อดีเอ็นเอปกติ (normal specific primer) ซึ่งเมื่อใช้คู่กับไพรเมอร์ P3 (common primer) แล้วทำพีซีอาร์จะเพิ่มชิ้นส่วนจาก P1-P3 ได้ในรูป A แต่เมื่อไพรเมอร์ P1 ไปจับกับ allele2 จะจับได้ไม่สมบูรณ์ปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์จะเปิดอ้าออกจึงไม่สามารถเป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปฏิกริยาได้เมื่อใช้คู่กับ P3 ในรูป B

ยีน HbE และการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน

Flatz, Pik และ Sringam (1967) รายงานว่าพบความถี่สูงของยีน HbE เฉพาะในแถบเอเชียอาคเนย์เท่านั้นต่อมาในปี ค.ศ.1987 Fucharoen และ Winichagoon ได้รายงานเหมือนกันว่าพบความถี่สูงของยีน HbE เฉพาะในแถบเอเชียอาคเนย์เช่นกัน โดยเฉพาะในบางพื้นที่พบความถี่สูงถึง 0.3 ยิ่งในชนกลุ่มน้อยที่แยกตัวออกมา (isolate tribe) จะพบความถี่ยีน HbE สูงถึง 0.5 Flatz และคณะยังสรุปเพิ่มเติมอีกว่ามักพบ

ความถี่ยีน HbE สูงในกลุ่มชาติพันธุ์มอญ-เขมรหรือในกลุ่มที่พูดภาษาออสโตร-เอเชียติก การพบความถี่ของยีน HbE สูงเฉพาะในภูมิภาคนี้เชื่อว่าเริ่มต้นจากการเกิดมิวเตชั่นของยีน HbA ไปเป็นยีน HbE และมีการกระจายความถี่ออกไปออกไปโดยการคัดเลือกทางธรรมชาติ (natural selection)

มีสมมุติฐานที่ยอมรับกันทั่วไปว่าสาเหตุที่พบความถี่ของยีน HbE สูงในแถบเอเชียอาคเนย์นี้เป็นผลมาจากการที่มีการระบาดของเชื้อมาเลเรียในอดีต (Kruatachue และคณะ, 1961) หลักฐานจากห้องปฏิบัติการของ Vernes และคณะ (1986); Lachant และ Tanaka (1987) ได้รายงานว่าเชื้อโปรโตซัวชนิด *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาเลเรียชนิดร้ายแรงจะเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควรในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความผิดปกติ ดังนั้นผู้ที่มียีนบีตาอีอาจมีความต้านทานต่อมาเลเรียสูงกว่าผู้ที่มีฮีโม-โกลบินปกติ (Flatz และคณะ, 1967)

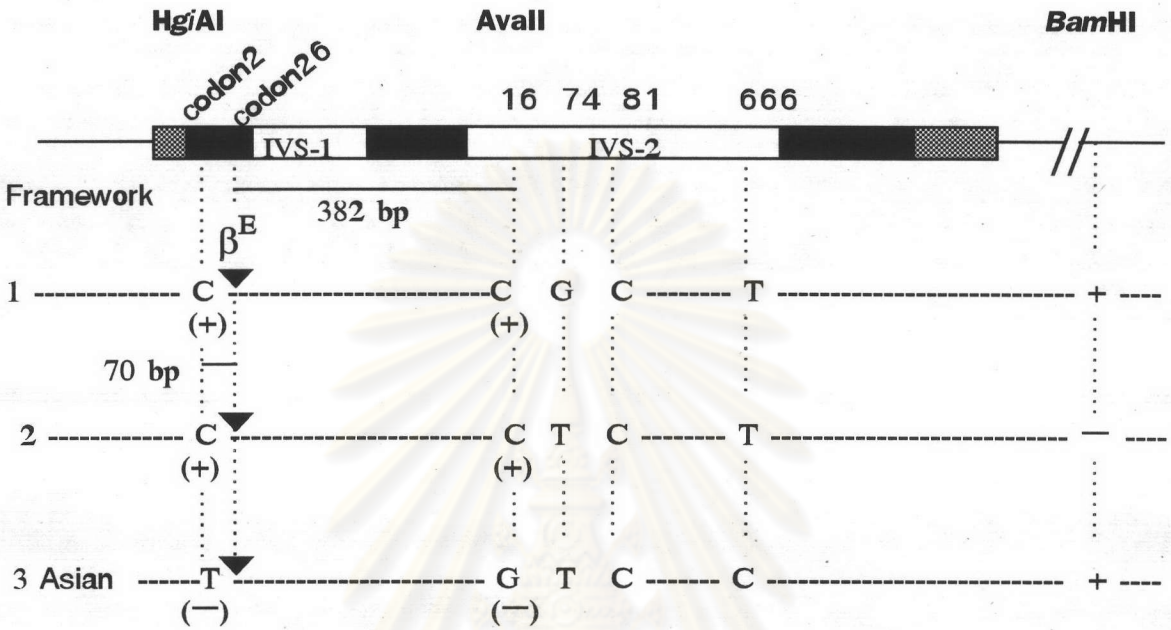
Deka และคณะ (1987) รายงานว่าพบความถี่ยีน HbE สูงถึง 0.5 ในชาวอัสสัม ประเทศอินเดียซึ่งเป็นความถี่ของยีนที่สูงกว่าที่ Flatz และคณะเคยรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1965 ในประชากรที่อยู่เขตชายแดนไทย-กัมพูชา

Antonarakis, Kazazian และ Orkin (1985) ได้รวบรวมและสรุปเป็นบทความชื่อ " DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster " ซึ่งได้กล่าวถึงการศึกษา DNA polymorphism ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินไว้ดังนี้ คนเราแต่ละคนมีข้อมูลทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันและมีการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกต่อไป ความแตกต่างที่ว่านี้คือมีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอซึ่งสามารถตรวจสอบ DNA polymorphisms ได้ 2 วิธี วิธีแรกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลสามารถทำได้โดยการโคลนบางชิ้นส่วนในจีโนม (genome) ของมนุษย์ (Maniatis และคณะ, 1978) วิธีที่สองโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการทำ gene mapping ซึ่งดีเอ็นเอจะถูกย่อยด้วยเอนไซน์ทำให้ได้ท่อนของดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบได้จากการทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นย้ายไปไว้บน filter sheet และให้ไฮบริไดซ์กับ DNA probe ที่มีสารกัมมันตภาพรังสีเทคนิคที่ว่านี้คือการทำ Southern blotting (Spense และคณะ, 1982)

ในปี ค.ศ. 1978 Lawn และคณะ กับ Kan และ Dozy ต่างก็ค้นพบ DNA polymorphism ภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน โดยใช้เทคนิค RFLPs และต่อมาได้มีการศึกษาเรื่องนี้อย่างแพร่หลาย จนกระทั่งปัจจุบันพบ polymorphic sites ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินนี้ถึง 17 ตำแหน่ง (Orkin และ Kazazian, 1984) แต่ละตำแหน่งของโพลีมอร์ฟิสม อ่านผลได้โดยดูการตัดได้ (+, presence) หรือตัดไม่ได้ (-, absence) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งนั้น ๆ รูปแบบ (pattern) ความสัมพันธ์ของ RFLPs บนโครโมโซมนี้เรียกว่าแฮปโพลไทป์ (haplotypes) (Orkin, Kazazian, Goff และ Antonarakis และคณะ, 1982)

Antonarakis และคณะ (1982a) ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า haplotype ดังนี้ "The pattern or combination of polymorphic restriction sites for any chromosome." เมื่อกำหนดให้ n เป็นจำนวนของ polymorphic restriction sites ดังนั้นจะมีจำนวนรูปแบบของแฮปโพลไทป์ที่เป็นไปได้ถึง 2^n รูปแบบเช่นมี polymorphic restriction sites 7 ตำแหน่ง ถ้าหากเป็นความสัมพันธ์แบบสุ่ม (randomly association) โอกาสที่จะพบแฮปโพลไทป์ได้ถึง $2^7 = 128$ รูปแบบ แต่ในความเป็นจริง การวิเคราะห์ polymorphic sites ที่ศึกษาในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินกลับพบแฮปโพลไทป์เพียงไม่กี่รูปแบบเท่านั้นชี้ให้เห็นว่าไม่ใช่ความสัมพันธ์แบบสุ่ม เนื่องจากมี linkage disequilibrium

Orkin, Kazazian, Antonarakis, Oster และคณะ, 1982) ศึกษา DNA haplotypes โดยอาศัย polymorphic restriction sites หลาย ๆ ตำแหน่งซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 จากปลายด้าน 5′ ไปถึงยีนบีตา-โกลบินเรียกว่า 5′-haplotype และส่วนที่ 2 จากปลายด้าน 3′ ถึงยีนบีตา-โกลบินเรียกส่วนนี้ว่า 3′-haplotype หรือ β-globin gene frameworks (FW) ซึ่งมี 3 ชนิดคือ ชนิด FW1 (AvaII + , BamHI +) ชนิด FW2 (AvaII + , BamHI -) และชนิด FW3 (AvaII - , BamHI +) สำหรับผู้ที่เป็นเฮเทอโรไซโกตทั้ง 2 ตำแหน่ง (AvaII +/-, BamHI +/-) ให้จัดเป็นเฮเทอโรไซโกตของชนิด FW2 และชนิด FW3 รายละเอียดของ β-globin gene frameworks แสดงไว้ในรูปที่ 1.10 ซึ่งประกอบด้วย ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (polymorphic



รูปที่ 1.10 ไดอะแกรมโครงสร้างของยีนบีตา-โกลบิน แสดง β-globin gene frameworks 3 ชนิดซึ่งแตกต่างกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงตำแหน่งที่เกิดยีนบีตาอี โดยที่ FW1 และ FW2 ต่างกันที่ 1 นิวคลีโอไทด์พบได้ในชาวคอเคเซียน และชาวเอเชีย สำหรับ FW3 Asian มีการเปลี่ยน 3 นิวคลีโอไทด์ (จาก FW2) พบในคนเอเชียและคนผิวดำ (Orkin และ Kazazian, 1984) เบสตัวที่ 3 ของโคดอน 2 (HgiAI site) และ ตำแหน่งที่ 16 ของ IVS-2 (AvaII site) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือนกันทำให้มีโพลีมอร์ฟิสมเหมือนกัน

▼ = ตำแหน่งของยีนบีตาอี, (+) และ (-) หมายถึงการตัดได้และตัดไม่ได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนโพลีมอร์ฟิก เรสตริกชั่น ไซท์

nucleotide) ในยีนบีตา-โกลบิน 4 แห่งคือ 1) นิวคลีโอไทด์ที่ 3 ของโคดอน 26 เป็น C หรือ T 2) ใน IVS-2 ตำแหน่งที่ 16 เป็น C หรือ G 3) ใน IVS-2 ตำแหน่งที่ 74 เป็น G หรือ T 4) ใน IVS-2 ตำแหน่งที่ 666 เป็น T หรือ C ซึ่ง FW1 และ FW2 ต่างกันที่ 1 นิวคลีโอไทด์ของ ตำแหน่งที่ 74 ใน IVS-2 , FW1 พบในชาวคอเคเซียน ส่วน FW2 พบในชาวเอเชีย สำหรับ FW3 Asian มีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ 3 แห่ง (จาก FW2) คือนิวคลีโอไทด์ที่ 3 ของโคดอน 2 และใน IVS-2 ตำแหน่งที่ 16, 666 ซึ่งพบชนิด FW3 นี้ได้ในชาวเอเชีย Antonarakis และคณะ (1984) ศึกษา DNA polymorphisms ที่สัมพันธ์กับยีน HbE จำนวน 23 โครโมโซม พบว่ายีน HbE มีหลายต้นกำเนิด (multiple origin) โดยตัดสินจากการที่มี DNA frameworks ที่แตกต่างกัน และในเอเชียอาคเนย์มีอย่างน้อย 2 ต้นกำเนิดโดยพบ β^E-globin gene frameworks 2 ชนิดคือ ชนิด FW2 และชนิด FW3 Asian กลไกที่ใช้อธิบาย β^E-globin gene frameworks 2 ชนิดที่แตกต่างกันในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือ อาจเกิดจาก 1) recurrent mutation หรือเกิดจาก 2) double crossing-over หรือเกิดจาก 3) two-single crossing-over อย่างไรก็ตาม Antonarakis และคณะได้ตั้งข้อสังเกตุว่า น่าจะเกิดจาก recurrent mutation ของโคดอน 26 (GAG-AAG) มากกว่าที่จะเกิดจาก crossing-over เพราะโอกาสที่จะเกิด crossing-over หรือ recombination นั้นมีน้อยมากเนื่องจากต้องเกิดขึ้นภายในช่วง 70 นิวคลีโอไทด์ จาก *Hgi*AI site ในโคดอน 2 ถึงโคดอน 26 ซึ่งเป็นช่วงที่สั้นมาก (รูปที่ 1.10) โดยเฉพาะการเปลี่ยนจาก FW2 ไปเป็น FW3 หรือจาก FW3 ไปเป็น FW2 นั้นจะต้องเกิด crossing-over ถึง 2 ครั้ง โดยต้องเกิดในช่วง 382 นิวคลีโอไทด์ จากโคดอน 26 ถึง Ava II site ใน IVS-2 ซึ่งก็ยังถือว่าเป็นช่วงสั้นเกินไปสำหรับการเกิด crossing-over ดังนั้น Antonarakis และคณะ สรุปว่าการมี β^E-globin gene frameworks ต่างกันแสดงว่าเป็นยีนบีตาอีโกลบินที่มีต้นกำเนิดต่างกัน (independent oigin) ในทางตรงกันข้าม การมี β^E-globin gene frameworks เหมือนกันแสดงว่าเป็นยีนบีตาอีโกลบินที่มีต้นกำเนิดเดียวกัน (dependent oigin)

Kazazian, Weber และคณะ (1984) ศึกษาในผู้ที่มีฮีโมโกลบินอีชนิดเฮ-เทอโรไซโกต (HbEA) 2 รายพบหนึ่งโครโมโซมมีแฮปโพลไทป์เป็น + - - - - β^E + + ซึ่งเป็นชนิด FW1 ที่ไม่เคยพบมาก่อน และสรุปว่าเป็นยีนบีตาอีที่มีต้นกำเนิดแยกต่างหากจากชนิดที่พบในเอเชียอาคเนย์ (separate mutation) อีกหนึ่งโครโมโซมมีแฮปโพลไทป์เป็น - + + - + β^E + - ซึ่งเป็น 5′-haplotype ที่ไม่เคยพบมาก่อน แต่อีก 4 ปีถัดมา Hundrieser และคณะ (1988a) พบแฮปโพลไทป์แบบเดียวกันนี้ในชาวอัสสัม ประเทศอินเดีย จึงสรุปว่าอาจมีการอพยพยีนนี้มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ไปสู่ทวีปยุโรปมากกว่าจะเป็นยีนที่มีต้นกำเนิดต่างกัน

ชนิดของ frameworks ที่แตกต่างกันเหล่านี้ใช้บ่งบอกการกระจายของเชื้อชาติได้ (racial divergence) ตามหลักของประชากรพันธุศาสตร์ (Population Genetics) การพบความถี่สูงของ β-globin gene frameworks ชนิดต่าง ๆในแต่ละกลุ่มประชากรของโลก เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีนอย่างรวดเร็ว (genetic drift) มากกว่าที่จะเป็นการคัดเลือก (selection) (Kazazian, Orkin และคณะ, 1984)

Hundrieser และคณะ (1988b) ศึกษาในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จำนวน 185 โครโมโซมพบว่า 81 % ของยีนฮีโมโกลบินปกติ หรือยีนบีตาเอมี 5-haplotype เป็น + - - - - และพบอยู่บนโครโมโซมชนิด FW1, FW2 และ FW3 ในขณะที่ 79 % ของยีนบีตาอี มี 5′-haplotype เป็น - + - + + และพบอยู่โครโมโซมชนิด FW2 แฮปโพลไทป์ที่แตกต่างกันของยีนบีตาเอ และยีนบีตาอีนี้ ชี้ให้เห็นว่า มิวเตชั่นที่ทำให้เกิดยีนบีตาอีมีต้นกำเนิดอยู่บนโครโมโซมที่มีแฮปโพลไทป์เป็น - + - + + β^E + - เท่านั้น การพบความถี่สูงของยีนบีตาอีที่มีแฮปโพลไทป์เป็น - + - + + β^E + - นี้ไม่ได้เป็นผลจากการมี selective advantage ของ combination แบบนี้ แต่น่าจะเป็นเพราะผลกระทบจากผู้ก่อตั้ง (founder effect) ของยีนบีตาอี ซึ่งต่อมาเพิ่มจำนวนมากขึ้นพร้อม ๆ กับการได้เปรียบของยีนบีตาอีมากกว่ายีนบีตาเออันเนื่องมาจากการระบาดของเชื้อมาเลเรียในอดีต และการที่ไม่พบยีนบีตาอีชนิด FW1 เลยเป็นการสนับสนุนงานของ Kazazian, Weber และคณะ ในปี ค.ศ. 1984 ที่รายงานว่ายีนบีตาอีในคนแถบเอเชีย

อาคเนย์มีต้นกำเนิดต่างกันกับยีนบีตาอีในชาวยุโรป สำหรับยีน HbE ชนิด FW3 ในกลุ่มประเทศอาเซียนพบเฉพาะในชาวเขมรเท่านั้น

การพบยีนบีตาอีชนิด FW3 ในคนเวียตนาม (Nakatsuji และคณะ, 1986) และในคนอีสานของประเทศไทย (Hundrieser และคณะ, 1988b) อาจอธิบายได้โดยความจริงที่มีอยู่ว่าส่วนหนึ่งของประชากรของเวียตนามและคนอีสานของไทยที่กล่าวถึงนี้เป็นคนเขมร หรือมีความเกี่ยวข้องกับคนเขมร (Voegelin และ Voegelin ,1977) ยีนบีตาอีชนิด FW3 นี้พบว่าความถี่จะสูงขึ้นจากภาคตะวันตกสู่ภาคตะวันออกของประเทศกัมพูชา Hundrieser และคณะตั้งข้อสังเกตุว่าต้นกำเนิดของยีนบีตาอีชนิด FW3 ในชาวเขมรน่าจะอยู่ทางภาคตะวันออกของประเทศกัมพูชาซึ่งเป็นที่ที่พบความถี่ยีนบีตาอีสูง (Livingstone,1985) และต่อมามีการอพยพไปสู่บริเวณข้างเคียง

Yongvanit และคณะ (1989) ทำการทดสอบสมมุติฐานที่กล่าวว่าในกลุ่มชนมอญ-เขมร จะพบความถี่สูงของยีน HbE ชนิด FW3 โดยทำการศึกษาประชากรทางภาคอีสานตอนเหนือของประเทศไทยและชาวโส้ที่อยู่ในเขตอำเภอกุสุมาน จังหวัดสกลนคร ซึ่งเป็นกลุ่มชนที่พูดภาษามอญ-เขมรเก่าเรียกว่า Karuic เป็นกลุ่มย่อยของมอญ-เขมร (Voegelin และ Voegelin, 1977) ในชาวโส้กลุ่มนี้ Livingstone (1985) เคยศึกษาและรายงานว่าเป็นประชากรกลุ่มแรกและกลุ่มเดียวในแถบเอเชียอาคเนย์ ที่พบความถี่ยีน HbE สูงที่สุด และ Sriboonlue และคณะ (1985) ก็รายงานว่าชาวโส้กลุ่มนี้เป็นประชากรเพียงกลุ่มเดียวในแถบนี้ที่พบยีน HbE ในความถี่สูงประมาณ 0.5 Yongvanit และคณะรายงานผลการศึกษา β^{E}-globin gene haplotypes ในชาวโส้ซึ่งคาดว่าจะพบยีน HbE ชนิด FW3 เหมือนในคนเขมร แต่กลับพบว่ามียีน HbE ในความถี่ที่สูงแต่ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซมชนิด FW2 ซึ่งเหมือนกับที่พบในประชากรทั่วไปของเอเชียอาคเนย์ ส่วนการพบความถี่สูงของยีน HbE ชนิด FW3 เฉพาะในชาวเขมร พอสรุปได้ว่าเกิดจากมีมิวเตชั่นแบบใดแบบหนึ่งคืออาจเกิดจาก point mutation, double crossing หรือ gene conversion ก็ได้ ยีน HbE ชนิด FW3 นี้ ไม่ถือว่าเป็นการได้เปรียบในการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอที่ดีกว่ายีน HbE ชนิด FW2 เพราะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเม็ดเลือดแดงระหว่างผู้ที่มียีน HbE ชนิด FW2 กับผู้ที่มียีน HbE ชนิด FW3

และการพบความถี่สูงของยีน HbE ชนิด FW3 เฉพาะในคนเขมรนี้ไม่ได้เกิดจาก การคัดเลือกโดยธรรมชาติ แต่เกิดจากผลกระทบจากผู้ก่อตั้ง

พีซีอาร์กับการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน

เทคนิคพีซีอาร์ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายรวดเร็วและทำให้ตัดปัญหาความยุ่งยากของวิธีเดิมที่ใช้คือวิธี Southern blotting และมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีเดิมดังนี้

1) เทคนิคพีซีอาร์สามารถมองเห็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้โดยตรงโดยการย้อมสีด้วยสารละลายเอธีเดียมโบรไมด์ โดยไม่ต้องย้ายดีเอ็นเอไปบนแผ่นกรองไนลอน หรือ nitrocellulose เพื่อทำไฮบริไดเซชั่น (hybridization)

2) ขั้นตอนการทำพีซีอาร์เสร็จภายใน 3-5 ชั่วโมง และการวิเคราะห์โดยใช้เรสตริกชั่นเอนไซม์สามารถทำได้เพียงชั่วข้ามคืน แล้วนำไปทำ เจล อิเลคโตรโฟเรซีสในวันต่อมา รวมขั้นตอนทั้งหมดประมาณ 2-3 วัน ซึ่งเทียบกับวิธีไฮบริไดเซชั่นที่ต้องใช้เวลา 6-10 วัน

3) ใช้จำนวนดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยกว่า

4) เทคนิคนี้ไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีซึ่งอาจเกิดอันตรายได้

Sutton, Bouchassira และ Nagel (1989) ได้ใช้เทคนิคนี้เพื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน ในผู้ป่วยที่มีฮีโมโกลบินเอส (HbS) จำนวน 18 ราย ปรากฏว่าได้ผลดี สามารถแยกโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตออกจากกันได้ง่าย โดยดูจากขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

Fucharoen และคณะ (1990) ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ สำหรับเทคนิคพีซีอาร์ได้อย่างรวดเร็วจากส่วนที่เป็น buffy coat fraction โดยไม่ต้องทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อน เพื่อนำไปศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินในผู้ป่วยและญาติของผู้ป่วยที่เป็นโฮโมไซโกตของฮีโมโกลบินอี (EE) จำนวน 9 ราย (18

โครโมโซม) ในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดใกล้เคียง พบว่าส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซมชนิด FW2 มีเพียง 2 โครโมโซมเท่านั้นที่เป็นชนิด FW1 ซึ่งเป็นชนิดที่พบในชาวยุโรป (Kazazian, Weber และคณะ, 1984) และไม่เคยพบมาก่อนในแถบเอเชียอาคเนย์โดยมีแฮปโพลไทป์เป็น + - - - - β^E + + และ - + - + + β^E + + ซึ่ง 5′-haplotype + - - - - นี้สามารถพบได้บ่อยในชาวอีสานของประเทศไทย (Yongvanit และคณะ, 1989) ดังนั้นเป็นไปได้ที่อาจจะเกิด recombination กับโครโมโซมอื่นที่มี 5′-haplotype เป็น - + - + + บริเวณจากปลาย 5′ ถึงยีนบีตา-โกลบิน ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด recombination ได้ง่ายเรียกบริเวณนี้ว่า hot spot region (Chakravarti และคณะ, 1984) การพบ DNA frameworks ทั้ง 3 ชนิดของโครโมโซมที่มียีนบีตาอีโกลบิน แสดงว่ายีนบีตาอีโกลบินในแถบเอเชียอาคเนย์มีหลายต้นกำเนิด

สุพรรณ ฟู่เจริญ และคณะ (2536) ศึกษาดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสมของยีนบีตาอีโกลบินโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในชนเผ่าซาไกซึ่งมีฮีโมโกลบินอีจำนวน 2 ราย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีนบีตาอีโกลบินในชนเผ่าซาไกและคนไทยน่าจะมีต้นกำเนิดเดียวกันและอาจเป็นผลมาจากมีการอพยพยีนระหว่างกลุ่มชนทั้งสอง (gene migration) โดยการแต่งงานข้ามกลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย