# การศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์โรค β-ธาลัสซีเมีย

# Investigation and technique development for β-thalassemia diagnosis.


ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ดาวัลย์ ฉิมภู่

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศาสตราจารย์เกียรติ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี

คณะหัวหน้าโครงการวิจัยย่อย

หัวหน้าโครงการย่อยที่ 1

ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2

ร.ท. หญิง สายศิริ มีระเสน

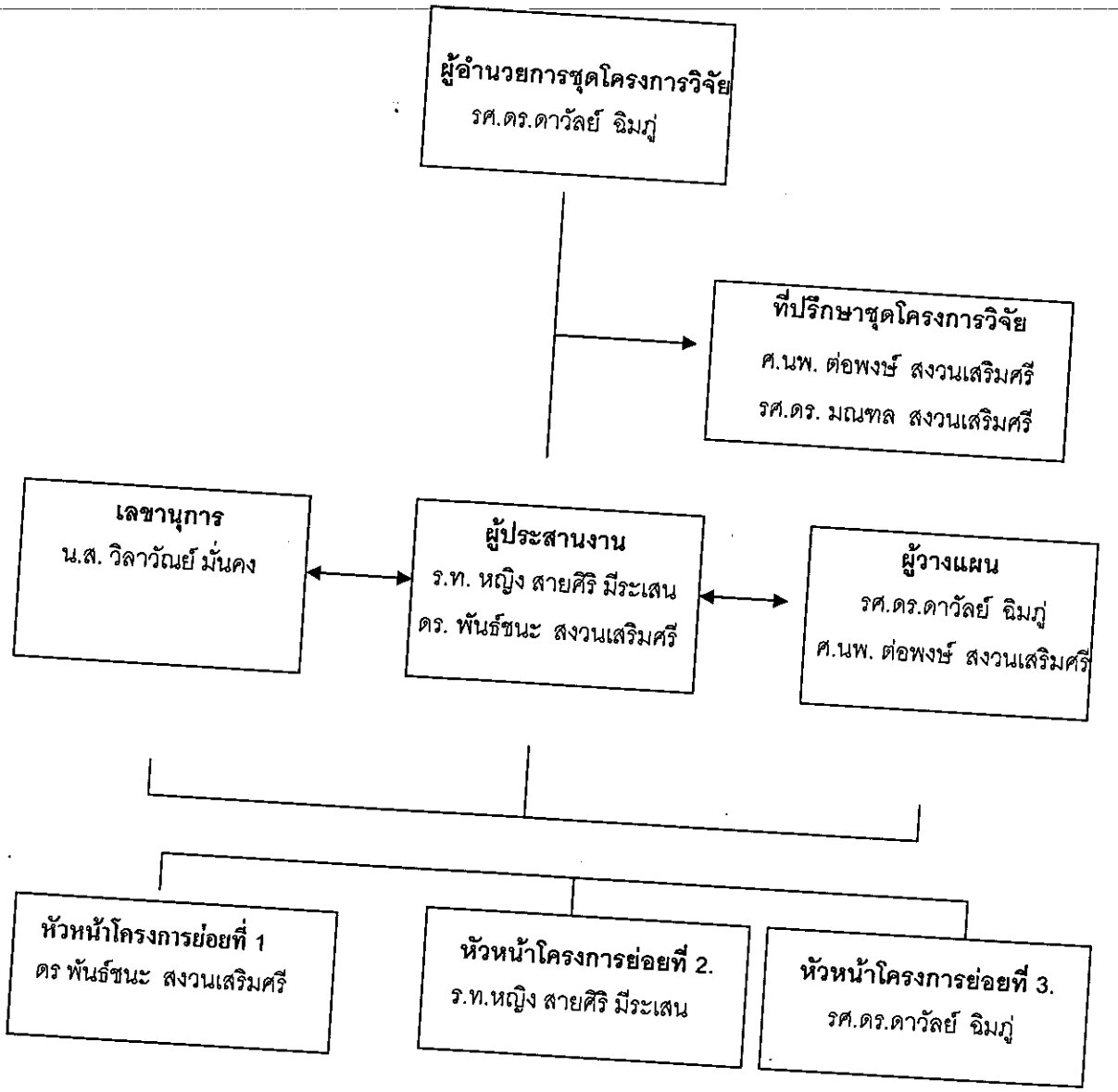
หัวหน้าโครงการย่อยที่ 3

รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่

คณะผู้ร่วมวิจัย

1. นายแพทย์ พีรพล วอง
2. ดร. สุธิรา เลิศตระกูล
3. ดร. จิราภรณ์ โตจรัส
4. นางสาวหนึ่งฤทัย นิ่มนุช
5. นางสาวปริศนา เจริญพร

## คณะผู้บริหารแผนงานวิจัย



## โครงการย่อยที่ 1

**ชื่อโครงการ** การศึกษายีนของฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย

Studies of hemoglobin E gene in hemoglobin E/$\beta^0$-thalassemia

**หัวหน้าโครงการ** ดร. พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

**ผู้ร่วมวิจัย**

1. นายแพทย์ พีรพล วอง
2. นางสาวหนึ่งฤทัย นิ่มนุช
3. นางสาวปริศนา เจริญพร

## โครงการย่อยที่ 2

**ชื่อโครงการ** การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดของโรคเบต้าธาลัสซีเมีย

prenatal diagnosis of $\beta$-thalassemia

**หัวหน้าโครงการ** ร.ท. หญิง สายศิริ มีระเสน

**ผู้ร่วมวิจัย**

1. นางสาววิลาวัลย์ มั่นคง

## โครงการย่อยที่ 3

**ชื่อโครงการ** โครงการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย

Thalasemia Counselling Programme .

**หัวหน้าโครงการ** รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่

**ผู้ร่วมวิจัย**

1. ดร. สุธิรา เลิศตระกูล
2. ดร. จิราภรณ์ โตจรัส

**ประเภทของงานวิจัย** : การวิจัยและพัฒนา

**สาขาวิชาที่ทำวิจัย** : สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

**วัตถุประสงค์**

1.หาสาเหตุของโรคในระดับโมเลกุลโดยการศึกษาหาโครงสร้างยีนของฮีโมโกลบินอี ในผู้ป่วยโรค ฮีโมโกลบินอี เบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย เพื่อใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ระหว่างความแตกต่างของโรคกับระดับความรุนแรง เป็นแนวทางในการรักษาโรค

2 เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของฟีตัส ในน้ำเลือดแม่ เพื่อให้คู่ สมรสมีโอกาสคัดเลือกเฉพาะลูกที่ปกติเท่านั้น เป็นแนวทาง เพื่อลด จำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรคนี้ลง

3. การตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชน

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ได้แนวทางรักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น
2. ลดจำนวนผู้เกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียโดยใช้เทคนิคการตรวจยีนธาลัสซีเมีย และ ยีนฮีโมโกลบินอีของฟีตัสในน้ำเลือดแม่ไปใช้ใน การวินิจฉัยก่อนคลอด

3.ทำให้ประชาชนในเขตภาคเหนือตอนล่างมีความรู้และเข้าใจถึงอันตรายของ โรคธาลัสซีเมีย

## บทนำ

โรคธาลัสซีเมีย(Thalassemia) เป็นโรคพันธุกรรมทางโลหิต ที่พบว่ามีอุบัติการสูงมากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ[1] ประเทศไทยมีประชากรที่มียีนธาลัสซีเมียและมีฮีโมโกลบินผิดปกติแฝงอยู่มากที่สุดในโลก[2] ประมาณ 20-30 ล้านคน โดยร้อยละ 20-30 ของประชากรไทยมียีนα-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 3-9 มียีน β-ธาลัสซีเมีย[3] และพบยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบมากอีก 2 ชนิด คือ Hb.E (hemoglobin E)โดยเฉลียพบประมาณร้อยละ 13 แต่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบสูงถึงร้อยละ 50 [4] อีกชนิดหนึ่งคือ Hb.CS. (hemoglobin Constant Spring) พบประมาณร้อยละ 4 [3] จากการที่ประชากรไทยจำนวนมากมียีนผิดปกติดังกล่าวแฝงอยู่จะนำไปสู่การเป็นโรคธาลัสซีเมียซึ่งเกิดจากการปฏิสัมพันธ์ของยีนผิดปกติ ดังกล่าว นั่นคือประชากรไทยมากกว่า 6แสนคน ( ประมาณร้อยละ 1 ของประเทศ)เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดหนึ่ง[5]

โรคธาลัสซีเมียที่พบบ่อยและเป็นปัญหาทางการแพทย์ที่สำคัญในประเทศไทยมี ทั้งชนิด α-ธาลัสซีเมีย และ β-ธาลัสซีเมีย เนื่องจากยีนธาลัสซีเมียมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบลักษณะด้อย(autosomal recessive ) ฉะนั้นผู้ที่มียีนผิดปกติเพียงยีนเดียวจึงเป็นเพียงพาหะของโรคเท่านั้นโดยผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียต้องได้รับยีนธาลัสซีเมียที่อยู่บนตำแหน่ง(locus)เดียวกันบนโครโมโซมที่คู่กันอย่างน้อย 2 ยีน หรือได้รับยีนธาลัสซีเมียร่วมกับยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดที่โกลบินเหมือนยีนธาลัสซีเมีย ด้วยโรคนี้เป็นโรคพันธุกรรมที่ไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาดได้(ยกเว้นวิธีการปลูกถ่ายไขกระดูกใหม่) การรักษาที่เป็นแบบมาตรฐานคือการให้เลือดและยาขับเหล็กรวมทั้งความพยายามในการรักษาโดยวิธีอื่นๆบ้างซึ่งวิธีการเหล่านี้ล้วนต้องมีค่าใช้จ่ายสูงมาก ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีประชากรที่มียีนธาลัสซีเมียและมีฮีโมโกลบินผิดปกติแพร่กระจายอยู่มากจึงเป็นไปได้ยากที่จะสามารถให้บริการการรักษาได้ทั่วถึง ประกอบกับการรักษาส่วนใหญ่เป็นการรักษาแบบประคับประคองกล่าวคือผู้ป่วยต้องมารับเลือดหรือยาขับเหล็กตลอดชีวิต

ปัจจุบันประชาชนชาวไทยเริ่มมีความรู้เกี่ยวกับโรคนี้มากขึ้น และต้องการได้การบริการที่ดีขึ้น ปัญหาของโรคนี้มากเกินกว่าจะตั้งรับอย่างเดียว แต่จะต้องมีแผนเชิงรุก เพื่อป้องกันและควบคุม หนทางที่ดีที่สุดในการป้องกันและควบคุมโรคนี้จะต้องประกอบด้วย 2 แนวทาง และต้องทำพร้อมกันดังนี้ คือ 1. หาทางรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด และ 2. หาทางลดจำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรคนี้ให้เหลือน้อยที่สุดหรือไม่มีผู้เกิดใหม่ที่เป็นโรคนี้เลย และที่สำคัญจะขาดไม่ได้คือการตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชน

ตลอด 30 ปีที่ผ่านมาได้มีความพยายามให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์โดยหวังผลว่าคู่รักที่เป็นพาหะทั้งคู่จะไม่แต่งงานกัน หรือการให้คำแนะนำแก่ผู้ที่สมรสกันแล้วและยังไม่มีลูกหรือเคยมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียแล้ว โดยหวังว่าคู่สมรสจะงดการมีลูก ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการที่ไม่ได้ผล มีเพียง

วิธีการเดียวที่ได้รับการตอบรับอย่างดีคือการเพิ่มทางเลือกใหม่ ให้คู่สมรสได้มีโอกาสคัดเลือกเฉพาะลูกที่ปกติเท่านั้น

เพื่อลดความทุกข์ทรมานของผู้ป่วยและครอบครัว คณะผู้วิจัยได้เสนองานวิจัยสำหรับป้องกันและควบคุม คือ

1. หาทางรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด
2. หาทางลดจำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรคนี้ให้เหลือน้อยที่สุดหรือไม่มีผู้เกิดใหม่ที่เป็นโรคนี้เลย และ
3. การตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชน

ฉะนั้นคณะผู้วิจัยหวังผลว่างานวิจัยนี้จะช่วยให้การป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมียได้ผลดีและคุ้มค่าขึ้น โดยผู้ที่เป็นโรคได้รับการรักษาดีขึ้นเรื่อยๆ และการป้องกันโรคจะดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว

**ผลกระทบเชิงเศรษฐกิจ สังคม และ สิ่งแวดล้อม**

มีประชาชนชาวไทยมากกว่า 600,000 คนที่ไม่สามารถใช้ชีวิตได้อย่างคนปกติต้องทนทุกขเวทนาด้วยโรคธาลัสซีเมีย พ่อแม่ ญาติและคนในครอบครัว ต้องลำบากและทุกขเวทนามากกว่าเพราะสงสารลูก นอกจากนี้การรักษาที่ทำได้ขณะนี้คือการให้เลือดและยาขับเหล็กตลอดชีวิตซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เป็นการเพิ่มภาระกดดันทางเศรษฐกิจอย่างยิ่งสำหรับคนจน เมื่อผู้ป่วยตายลง (อายุ~29ปี)หลังจากก่อความผูกพันในฐานะ พ่อ-แม่-ลูก มานาน จะเป็นโศกนาฏกรรมสำหรับครอบครัวที่มีลูกเป็นโรคนี้ จะเห็นได้ว่าโรคธาลัสซีเมีย นอกจากจะเป็นปัญหาทางสาธารณสุขแล้วยังเป็นปัญหา เศรษฐกิจและสังคมของประเทศ ด้วย

**ขอบเขตการวิจัย**

ขอบเขตการวิจัยประกอบด้วย 3 แนวทาง

แนวทางที่ 1. หาสาเหตุของโรคในระดับโมเลกุลโดยการศึกษาหาโครงสร้างยีนของฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอี เบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย เพื่อใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของโรคกับระดับความรุนแรง เป็นแนวทางในการรักษาโรค

แนวทางที่ 2 โดยการพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของพีดัสในน้ำเลือดแม่ เพื่อให้คู่ สมรสมีโอกาสคัดเลือกเฉพาะลูกที่ปกติเท่านั้น เป็นแนวทางเพื่อลดจำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรคนี้ลง

แนวทางที่ 3. การตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชนโดยเฉพาะผู้หญิงท้องที่มาฝากครรภ์ในโรงพยาบาล

## ตารางแสดง ผลที่ได้รับจากโครงการวิจัย เป็นจำนวนนับ

| ผลงาน | ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ | ปีที่ 1-2 |
|---|---|---|
| 1. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ | - | ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ |
| 2. เทคโนโลยี | 1 | ได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการหา<br>1.ลำดับของDNA ในβ$^0$-globin chain ของ Hb E trait<br>2.ได้เทคนิคการตรวจยีนธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของพีตัสในน้ำเลือดแม่ |
| 3. กระบวนการผลิต | 1 | ได้กระบวนการที่เหมาะสมในการ<br>1. ลำดับของDNA ในβ$^0$-globin chain ของ Hb E trait<br>2. ได้เทคนิคการตรวจยีนธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของพีตัสในน้ำเลือดแม่ |
| 4. องค์ความรู้ใหม่ | 1 | องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการ<br>1. หาความรุนแรงของโรคβ$^0$-thal-Hb E<br>2. ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ |
| 5. การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ | 1 | - |
| 6. การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะ | 1 | การตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชน |
| 7. การผลิตบัณฑิตปริญญาเอก | 2 | สาขา วท.ด.(สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ) |
| 8. สิทธิบัตร | 1 | - |
| 9. บทความทางวิชาการ | 4 | วารสารต่างประเทศ |
| 10.การเสนอผลงานในการประชุม | 1<br>4 | การประชุมระดับนานาชาติ<br>การประชุมระดับชาติ |

**งบประมาณ (ที่ปี 2547-48) รวมทั้งสิ้น** 1,236,000 บาท

งบประมาณที่ขอในปี 1. รวม 648,000 บาท

งบประมาณที่ขอในปี 2. รวม 588,000 บาท

*Reference*


1.Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairom V, Siriboon W(1991) Review :Prenatal Diagnosis thalassemia and Hemoglobinopaties in Thailand. Asean J. Trop. Med Public Health 22(1) : 16-29.

2. Livingston FB(1985) Frequencies of hemoglobin variants, thalassemia, the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency ,G6PD variants and ovalocytosis in human population. Oxford University Press, Oxford.

3.Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravatmuang P, Winichagoon P, Fucharoen S (1980) Thalassemia in Thailand . Ann NY Acad Aci 344:352-363.

4.Na-Nakorn S, Minnich V, Chernoff AI, Quaggui-Puag S, and Chavalekviraj K: Studies on haemoglobin E. II: The incidence of haemoglobin E in Thailand. J Lab Clin Med 1956; 47: 490-498.

5.Na-Nakorn S and Wasi P: The distribution of hemoglobin E: hemoglobin E triangle in Southeast Asia. Med Assoc Thai 1978; 61: 65.

6.Pravatmuang P, Tiloklurs M, Suannum M, and Chaipat C: Phitsanulok population: The highest incidence of hemoglobin E in the northern province of Thailand and PND counseling. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995; 26 Suppl 1: 266-270.

7.Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed, Oxford: Blackwell Science, 2001

8.Na-Nakorn S, Minnich V, Chernoff AI, Quaggui-Puag S, and Chavalekviraj K: Studies on haemoglobin E. II: The incidence of haemoglobin E in Thailand. J Lab Clin Med 1956; 47: 490-498.

9 Na-Nakorn S and Wasi P: The distribution of hemoglobin E: hemoglobin E triangle in Southeast Asia. Med Assoc Thai 1978; 61: 65.

10.Wasi P: Haemoglobinopathies including thalassemia. I Tropical Asia. Clin Hematol 1981; 10: 707-729.

11. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, ธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง การรักษา การควบคุมและป้องกัน; กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับภาควิชากุมารเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2543

12 ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, ภัทรา ธนรัตนากร, ไฮริส เอฟ เสตเกอร์, สุรสิทธิ์ ชมชื่น, ธีระ ทองสงค์, พฤหัส จันทร์ประภาส, พรรณี สิริวรรณธนาภา, และสุพัตรา ศิริโชติยกุล, การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค Homozygous β-thalassemia โดยการวิเคราะห์ชนิดของ Fetal Hb ด้วย Automated HPLC, วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543; 10: 91-101.

โครงการย่อยที่ 1

# การศึกษายีนของฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย

Studies of hemoglobin E gene in hemoglobin E/$\beta^0$-thalassemia

โดย

ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

# โครงการย่อยที่ 1

**ชื่อโครงการ** การศึกษายีนของฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย

Studies of hemoglobin E gene in hemoglobin E/$\beta^0$-thalassemia


**หัวหน้าโครงการ** ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

**ที่ปรึกษาโครงการวิจัย** ศาสตราจารย์เกียรติ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี
รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี

**ผู้ร่วมวิจัย**
1. นายแพทย์ พีรพล วอง
2. นางสาวหนึ่งฤทัย นิ่มนุช
3. นางสาวปริศนา เจริญพร


**วัตถุประสงค์ของการศึกษา**

เพื่อศึกษาความแตกต่างในรูปแบบของ DNA ของฮีโมโกลบินอี รวมทั้งแบบแผนของการผ่าเหล่าอื่นๆ ที่ปรากฏในยีนของเบต้าโกลบิน ที่พบในผู้ป่วยโรคเบต้าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างดังกล่าวกับระดับความรุนแรงของโรค

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างในรูปแบบของ DNA ของฮีโมโกลบินอีอาจใช้เป็นข้อบ่งชี้ในการให้การ ปรึกษาทางพันธุกรรมในการตรวจหาคู่เสี่ยง, การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมก่อนการตั้งครรภ์รูปแบบของ DNA polymorphism ของยีนเบต้าโกลบินที่พบในยีนของฮีโมโกลบินอีการพัฒนาวิธีตรวจสอบชนิดมิวเตชั่นของเบต้าธาลัสซีเมียอาจพบความผิดปกติชนิดใหม่ของเบต้าธาลัสซีเมียที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

**บทนำ**

ฮีโมโกลบินอี ($\alpha_2\beta_2^{26glu->lys}$) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยที่สุดในประเทศไทย เมื่อไปรวมกับยีนเบต้าธาลัสซีเมียทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าธาลัสซีเมียซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพวก thalassemia intermedia มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไปตั้งแต่รุนแรงมากคล้ายพวกโฮโมไซกัสเบต้าธาลัสซีเมีย จนถึงพวกที่มีความรุนแรงปานกลาง ในปัจจุบันยังไม่สามารถหาตัวกำหนดที่ชัดเจนถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันในลักษณะทางคลินิก ทำให้เกิดความยุ่งยากในการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมโดยเฉพาะในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโดยการให้เลือดอย่างสม่ำเสมอและการให้คำปรึกษาที่เหมาะสมเมื่อมีการวินิจฉัยก่อนคลอดหรือการยุติการตั้งครรภ์ในรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เลือดของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมียมาทำการสกัดดีเอ็นเอเพิ่มจำนวนยีนส่วนของยีนเบต้าโกลบินด้วยเทคนิค PCR ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนเบต้าโกลบินและโคลนยีนเบต้าโกลบินเข้าไปใน *E. coli* โดยใช้ plasmid ที่เหมาะสมเพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนในแต่ละข้างทั้งในส่วนของยีนฮีโมโกลบินอีและยีนเบต้าธาลัสซีเมีย ผลที่ได้จะนำมาศึกษาเปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์กับความแตกต่างในลักษณะทางคลินิก หรือหารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีโมโกลบินอีที่พบในประเทศไทย (genetic polymorphism)

**ผลกระทบเชิงเศรษฐกิจ สังคม และ สิ่งแวดล้อม**

มีประชาชนชาวไทยมากกว่า 600,000 คนที่ไม่สามารถใช้ชีวิตได้อย่างคนปกติต้องทนทุกขเวทนาด้วยโรคธาลัสซีเมีย พ่อแม่ ญาติและคนในครอบครัว ต้องลำบากและทุกขเวทนามากกว่าเพราะสงสารลูก นอกจากนี้การรักษาที่ทำได้ขณะนี้คือการให้เลือดและยาขับเหล็กตลอดชีวิตซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เป็นการเพิ่มภาระกดดันทางเศรษฐกิจอย่างยิ่งสำหรับคนจน เมื่อผู้ป่วยตายลง (อายุ~29ปี)หลังจากก่อความผูกพันในฐานะ พ่อ-แม่-ลูก มานาน จะเป็นโศกนาฏกรรมสำหรับครอบครัวที่มีลูกเป็นโรคนี้ จะเห็นได้ว่าโรคธาลัสซีเมีย นอกจากจะเป็นปัญหาทางสาธารณสุขแล้วยังเป็นปัญหา เศรษฐกิจและสังคมของประเทศ ด้วย

**ขอบเขตการวิจัย**

ประกอบด้วย

การหาสาเหตุของโรคในระดับโมเลกุลโดยการศึกษาหาโครงสร้างยีนของฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอี เบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย เพื่อใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของโรคกับระดับความรุนแรง เป็นแนวทางในการรักษาโรคธาลัสซีเมีย

## แผนการดำเนินงาน ขอบเขต และวิธีวิจัย

แผนการดำเนินงาน&วิธีการวิจัย

### แผนการดำเนินงาน

ศึกษาจากกลุ่มประชากรที่เป็นโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมียที่มีลักษณะความรุนแรงทางคลีนิคแตกต่างกันจำนวนประมาณ 20 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเลือดจะผ่านการตรวจด้วยวิธี Two minutes erythrocyte osmotic fragility test[20], HbE screening[21], HbA2 test[22, 23], และ gap PCR for $\alpha$-thalassemia 1-Southeast Asia Type[24, 25] ก่อนทำการศึกษา

### วิธีการวิจัย

1) สกัด DNA จากเลือดของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมียด้วยวิธีซึ่งประยุกต์มาจาก Chelex-100 extraction method[12] หรือใช้วิธีอื่นๆเช่นการใช้ commercial kit[13]
2) เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนเบต้าโกลบินด้วยเทคนิค touchdown PCR[14, 15] โดย primer ที่ใช้วางอยู่ในตำแหน่ง -654 ของ cap site ไปจนถึงตำแหน่งที่ 255 นับต่อจาก 3'end ของ poly-A tail (ขนาดรวม 2,535 เบส)
3) ทดสอบ PCR product ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis กับ molecular weight marker,

รวมทั้งทดสอบการตัดได้ด้วย restriction enzyme และการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ที่อยู่ภายในชิ้นส่วนของ PCR product

4) นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 2. ไปเป็นแม่แบบสำหรับการทำ asymmetric PCR โดยวิธี dye terminator cycle sequencing[16, 17]
5) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer[18] ซึ่งผลที่ได้จะนำไปเทียบกับลำดับเบสของยีนเบต้าโกลบินปกติจาก GenBank[27, 29] เพื่อหาตำแหน่งของ mutation
6) PCR product จากข้อ 2. จะนำมาแยกคู่ของ DNA ที่ได้รับมาจากพ่อและแม่ออกจากกันและเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค DNA cloning[19] ทำการตรวจสอบคัดเลือก colony ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับ gene แยก plasmid ของแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อนำ plasmid ที่ได้ไปทำ asymmetric PCR[16, 17] และใช้เครื่อง automated DNA sequencer[18] เพื่อหาลำดับเบสและกำหนดรูปแบบของยีนที่ผิดปกติต่อไป

7) ผลการทดลองที่ได้จากข้อ 5. และ ข้อ 6. จะนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อให้ทราบลำดับเบสของ DNA อีกคู่หนึ่งซึ่งไม่ได้ทำการหาลำดับเบสจากข้อ 6.

8) เปรียบเทียบความผันแปรในบริเวณต่างๆ ของยีนเบต้าโกลบินในส่วนของฮีโมโกลบินอีที่ได้ จากการตรวจลำดับ DNA เปรียบเทียบความสัมพันธ์กับอาการและค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่าง

---

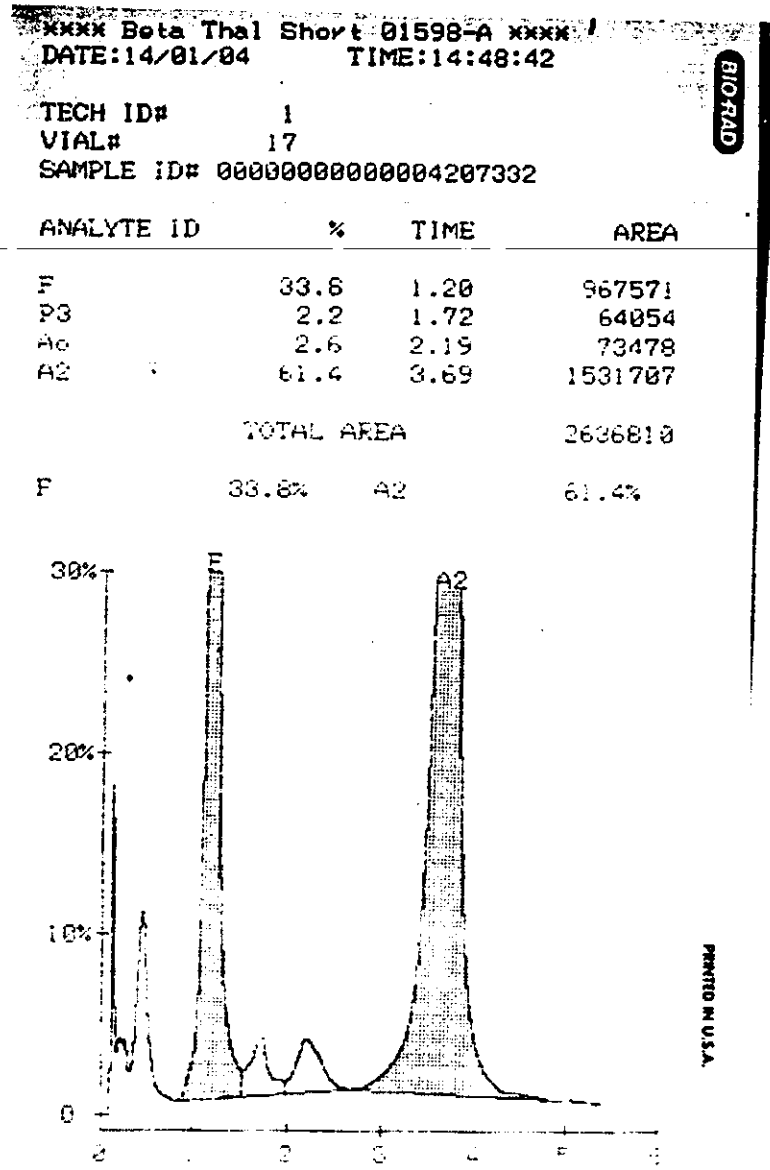
การดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

**การคัดเลือกคนไข้**

จากผู้ป่วยฮีโมโกลบินอีเบต้าธาลัสซีเมียตั้งแต่วันที่ 14 สิงหาคม 2546 ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก สามารถรวบรวมผู้ป่วยและยังคงสามารถติดตามการรักษาได้ 9 ราย ซึ่งในจำนวนดังกล่าวเป็นผู้ป่วยที่มีอาการปานกลาง (thalassemia intermedia) จำนวน 5 ราย และมีอาการรุนแรง (thalassemia major) จำนวน 4 ราย ส่วนคนไข้ที่ยังไม่ครบจำนวนได้ทำการประสานไปยังหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีตัวอย่างเลือดและประวัติผู้ป่วยฮีโมโกลบินอีเบต้าธาลัสซีเมีย ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความเชื่อมั่นว่าจะสามารถรวบรวมตัวอย่างผู้ป่วยได้ครบตามจำนวน

**การตรวจยืนยันฮีโมโกลบินอีเบต้าธาลัสซีเมีย**

การตรวจยืนยันฮีโมโกลบินอีเบต้าธาลัสซีเมียในส่วนของ HbE screening และ HbA2 test โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วย Variant™ Beta Thalassemia Short Program บนเครื่อง Variant™ Hemoglobin Testing System (BIORAD) ซึ่งให้ retention time ของ HbE อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับ HbA2 ดังตัวอย่างในรูปที่ 1 ส่วน HbA ที่พบเป็นผลจากการได้รับเลือด พบว่าสัดส่วน HbE + HbA2 ในคนไข้ทั้ง 8 รายอยู่ระหว่าง 54.8-79.7% และ HbF อยู่ระหว่าง 15.2-39.8% (ตารางที่ 1)




รูปที่ 1. ตัวอย่าง Chromatogram ของผู้ป่วยฮีโมโกลบินอีเบต้าธาลัสซีเมีย ระดับ HbA ที่ปรากฏ (2.6%) คาดว่าเป็นผลจากการได้รับเลือดในการรักษาแบบประคับประคอง

ตารางที่ 1. ระดับ HbE+HbA2 และ ระดับ HbF ในผู้ป่วย 9 รายที่ศึกษา

| ลำดับที่ | รหัส | % HbA2 + HbE | %HbF |
|---|---|---|---|
| 1 | 001 | 69.2 | 27.0 |
| 2 | 002 | 79.7 | 15.2 |
| 3 | 003 | 54.8 | 39.8 |
| 4 | 004 | 79.5 | 15.9 |
| 5 | 005 | 69.0 | 26.3 |
| 6 | 007 | 72.5 | 15.5 |
| 7 | 008 | 66.8 | 27.7 |
| 8 | 009 | 66.5 | 15.3 |
| 9 | 010 | 61.4 | 33.8 |

**การตรวจหาพาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมียในกลุ่มผู้ป่วย**

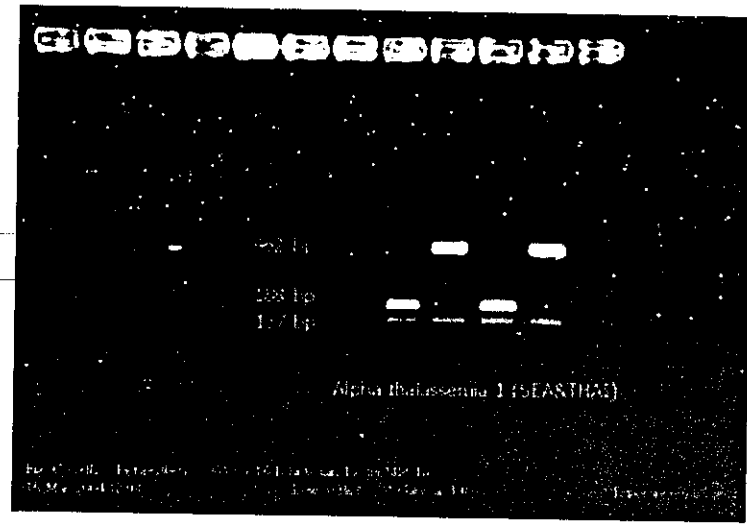
เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะพาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมียมีผลลด Oxidative stress ของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย โดยทำให้การเสียสมดุลเนื่องจากตะกอนของอัลฟ่าโกลบินที่เป็นอิสระลดลง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น (Forget 2001) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้มีการทดสอบการเป็นพาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมีย-1 ซึ่งมีรายงานในประเทศไทยคือ Southeast Asia deletion และ Thai deletion ด้วยวิธี multiplex gap PCR และทดสอบการเป็นพาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมีย-2 ชนิดที่มีการขาดหายไปขนาด 3.7 kb และ 4.2 kb ด้วยวิธี PCR และการตรวจหาการเป็นพาหะของฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง (Hb Constant Spring) ในกลุ่มคนไข้ที่ศึกษา

ทำการสกัด DNA จากผู้ป่วย 8 รายแรก โดยวิธี silica gel membrane absorption จากเม็ดเลือดขาวด้วย QIAamp® DNA Blood Minikit (QIAGEN) ตามวิธีที่ผู้ผลิตกำหนด โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเลือดครบ 200 μL และปริมาณล้างสุดท้าย (elution) ด้วย buffer 200 μL เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

วิธี Multiplex gap PCR ที่ใช้ในการตรวจพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย-1 Southeast Asia type deletion และ Thai type deletion เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาจากวิธี gap PCR เดิมที่ใช้ในการตรวจคัดกรองพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย-1 Southeast Asia type deletion เพียงอย่างเดียว (Sanguansermsri et al. 1999) โดยชุดของ primer ที่ใช้ประกอบด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| Th1: | 5' | cct cct ggg att aca tct gg | 3' sense |
| Th2: | 5' | gca cct ctg ggt agg ttc tg | 3' antisense |
| Th3: | 5' | ccc ctg aca atc tca tca tct | 3' sense |
| P1: | 5' | gcg atc tgg gct ctg tgt tct | 3' sense |
| P3: | 5' | gcc ttg aac tcc tgg act taa | 3' antisense |

ปฏิกริยา 25 μL ประกอบด้วย DNA ที่สกัด 5 μL โดยมี 0.5 unit ของ Taq DNA polymerase, 1x PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 1x Q solution (QIAGEN), 0.2 mM dNTPs, 0.4 μM Th1, 0.6 μM Th2, 0.6 μM Th3, 0.4 μM P1 และ 0.4 μM P3 โดย PCR condition ประกอบด้วย 94 °C 2.30 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94 °C 40 วินาที, annealing ที่ 56 °C 45 วินาที และ extension ที่ 72 °C 2 นาที และเพิ่ม extension time ในรอบสุดท้ายอีก 7 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis ที่ 120 volt นาน 20 นาทีใน 1x TBE buffer จะได้ PCR product ขนาด 137 bp สำหรับยีนที่อยู่บนโครโมโซมข้างที่ปกติ ได้ PCR product ขนาด 188 bp สำหรับยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย-1 Southeast Asia type deletion และได้ PCR product ขนาด 462 bp สำหรับยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย-1 Thai type deletion (เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์ 2547) ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งการศึกษาในผู้ป่วยทั้ง 8 รายไม่พบการเป็นพาหะของยีนทั้ง 2 ชนิด



รูปที่ 2. ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ multiplex gap PCR สำหรับการตรวจพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย-1 Southeast Asia type deletion และ Thai type deletion ตัวอย่างที่ 1 และ 3 (จากซ้าย) เป็นพาหะของยีน Southeast Asia type deletion ส่วนตัวอย่างที่ 2 และ 4 เป็นพาหะของยีน Thai type deletion

การทดสอบการเป็นพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย-2 ชนิดที่มีการขาดหายไป 3.7 kb และชนิดที่มีการขาดหายไป 4.2 kb เนื่องจาก unequal crossing over ของยีน HBA2 และ HBA1 ใช้วิธี PCR โดยชนิดที่มีการขาดหายไปของยีน 3.7 kb มีชุดของ primer ที่ใช้คือ

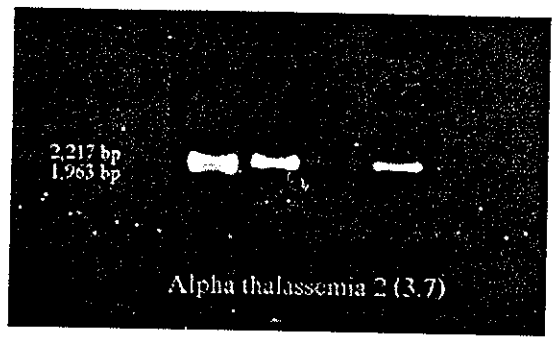
P1: 5' aag tcc acc cct tcc ttc ctc acc 3' sense

P2: 5' atg aga gaa atg ttc tgg cac ctg cac ttg 3' antisense

P3: 5' tcc atc ccc tcc tcc cgc ccc tgc ctt ttc 3' antisense

ปฏิกริยา 25 µL ประกอบด้วย 2.5 µL ของ 10x buffer, 5 µL ของ 5x Q solution, 0.3 µL ของ Taq DNA polymerase (QIAGEN), 2.5 µL ของ 2 mM dNTPs 2.0 µL ของ 5 µM primer น้ำกลั่น 7.7 µL และ DNA template 5 µL โดย PCR condition ประกอบด้วย ประกอบด้วย 95 $^{o}$C 4 นาที ตามด้วย

35 รอบของ denaturation ที่ 95 °C 1 นาที, annealing ที่ 69 °C 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 2.30 นาที และเพิ่ม extension time ในรอบสุดท้ายอีก 7 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis ที่ 165 volt นาน 35 นาทีใน 1x TBE buffer จะได้ PCR product ขนาด 2,217 bp สำหรับยีนที่อยู่บนโครโมโซมข้างที่ปกติ และได้ PCR product ขนาด 1,963 bp สำหรับยีนที่มีการขาดหายไป (Liu et al. 2000) ดังตัวอย่างในรูปที่ 3 โดยการศึกษาในผู้ป่วย 8 รายพบผู้ป่วยรายที่ 2 (002) เพียงรายเดียวที่เป็นพาหะของยีนผิดปกติ




รูปที่ 3. ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR สำหรับตรวจพาหะ อัลฟ่าธาลัสซีเมีย-2 ชนิดที่มีการขาดหายไปของยีน 3.7 kb ตัวอย่างที่ 1 (จากซ้าย) เป็นพาหะของยีนผิดปกติ deletion ส่วนตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4 ไม่มียีนที่ผิดปกติ

สำหรับการทดสอบการเป็นพาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมีย-2 ชนิดที่มีการขาดหายไป 4.2 kb ชุดของ primer ที่ใช้ประกอบด้วย

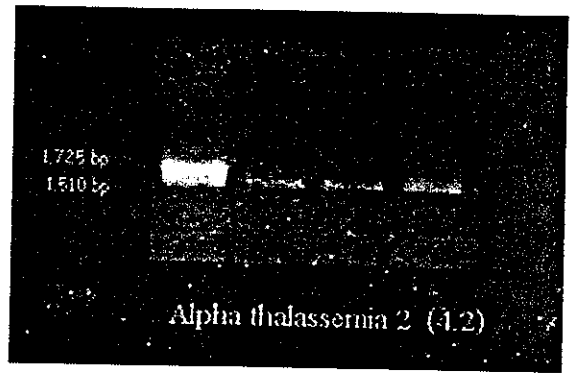
P1: 5' tcc tga tct ttg aat gaa gtc cga gta ggc 3'

P2: 5' tgg ggg tgg gtg tga gga gac agg aaa gag aga 3'

P3: 5' atc act gat aag tca ttt cct ggg ggt ctg 3'

โดย P1 เป็น sense primer ส่วน P2 และ P3 เป็น antisense primer ในปฏิกริยา 25 μL ประกอบด้วย 2.5 μL ของ 10x buffer, 5 μL ของ 5x Q solution, 0.3 μL ของ Taq DNA polymerase (QIAGEN), 2.5 μL ของ 2 mM dNTPs 2.0 μL ของ 5 μM primer น้ำกลั่น 7.7 μL และ DNA template 5 μL โดย PCR condition ประกอบด้วย ประกอบด้วย 95 °C 4 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 95 °C 1 นาที, annealing ที่ 65 °C 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 2 นาที และเพิ่ม extension time

ในรอบสุดท้ายอีก 7 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis ที่ 165 volt นาน 35 นาทีใน 1x TBE buffer จะได้ PCR product ขนาด 1,510 bp สำหรับยีนที่อยู่บนโครโมโซมข้างที่ปกติ และได้ PCR product ขนาด 1,725 bp สำหรับยีนที่มีการขาดหายไป (Liu et al. 2000) ดังตัวอย่างในรูปที่ 4 ซึ่งการศึกษาในผู้ป่วยทั้ง 8 รายไม่พบการเป็นพาหะของยีนที่ผิดปกติดังกล่าว




รูปที่ 4. ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR สำหรับตรวจพาหะ อัลฟ่าธาลัสซีเมีย-2 ชนิดที่มีการขาดหายไปของยีน 4.2 kb ตัวอย่างที่ 1 (จากซ้าย) เป็นพาหะของยีนผิดปกติ deletion ส่วนตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4 ไม่มียีนที่ผิดปกติ

วิธีที่ใช้ในการทดสอบการเป็นพาหะของยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงประยุกต์จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Makonkawkeyoon et al. 1993) โดยวิธี PCR เพื่อจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ที่ครอบคลุมบริเวณที่เกิด mutation ที่ termination codon ของยีน HBA2 โดย primer ที่ใช้ประกอบด้วย

P1: 5' tgc ggg cct ggg ccg cac tga 3' sense

P2: 5' gcc gcc cac tca gac ttt att 3' antisense

โดย PCR condition ประกอบด้วย ประกอบด้วย 94 °C 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94 °C 1 นาที, annealing ที่ 65 °C 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 1 นาที และเพิ่ม extension time ในรอบสุดท้ายอีก 5 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis ที่ 160 volt นาน 18 นาทีใน 1x TBE buffer จะได้ PCR product ขนาด 276 bp ซึ่งกรณีของยีน HBA2 ปกติสามารถตัดได้ด้วย enzyme MseI ได้ PCR product ขนาด 111 และ 165 bp (Makonkawkeyoon et al.

1993) ในกรณีของ mutation ของฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงจะทำให้จุดตัดดังกล่าวหายไป ดังตัวอย่างในรูปที่ 5 ซึ่งการศึกษาในผู้ป่วยทั้ง 8 รายไม่พบการเป็นพาหะของยีนที่ผิดปกติดังกล่าว

รูปที่ 5. ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR สำหรับตรวจของฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง หลังจากตัดด้วย MseI โดยตัวอย่างที่ 1 (จากซ้าย) เป็นพาหะของยีนผิดปกติ

**การเพิ่มจำนวนยีนเบต้าโกลบินด้วยวิธี PCR**

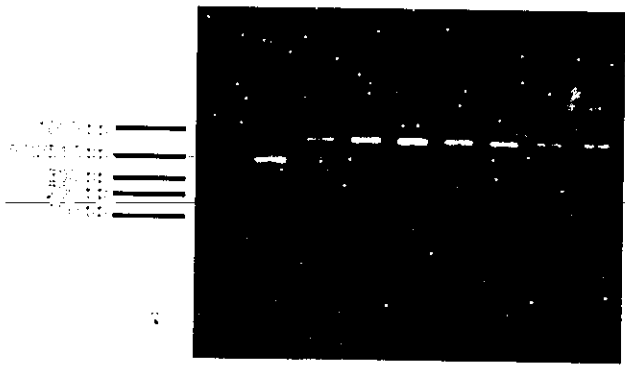
การเพิ่มจำนวนยีนเบต้าโกลบินเพื่อการหาลำดับเบสและหาชนิดของการกลายพันธุ์ของเบต้าธาลัสซีเมียที่พบร่วมกับยีนของฮีโมโกลบินอีรวมทั้งตรวจสอบความผิดปกติอื่นๆ ภายในยีนของฮีโมโกลบินอี ทำโดยใช้วิธี PCR

ขั้นตอนของ PCR ซึ่งใช้คู่ของ primer ที่ครอบคลุมส่วน promoter, exon 1, IVS-1, exon 2 และส่วนต้นของ IVS-2 ของยีนเบต้าโกลบิน โดยมีลำดับเบสดังนี้

X1-2s: 5' aga aga gcc aag gac agg tac g 3' sense

X1-2a: 5' tgc aat cat tcg tct gtt tcc c 3' antisense

โดยปฏิกริยา 50 μL ประกอบด้วย 5 μL ของ DNA ที่สกัดได้ 1x Taq buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.4 μM ของแต่ละ primer, และ 1 unit ของ Amplitaq Gold® DNA Polymerase (Applied BioSystems) โดย PCR condition ประกอบด้วย 95 °C 10 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation ที่ 95 °C 45 วินาที, annealing ที่ 60 °C 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 2 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis จะได้ PCR product ขนาด 760 bp (Sanguansermsri et al. 2001) ดังตัวอย่างในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR product ที่มียีนเบต้าโกลบินในส่วนของ promoter exon 1, IVS-1, exon 2 และส่วนต้นของ IVS-2

คู่ของ primer ซึ่งครอบคลุมส่วนท้ายของ IVS-2, exon 3 รวมไปถึงส่วน poly A tail signal ของยีนเบต้าโกลบินโดยมีลำดับเบสดังนี้

X3s: 5' tcc cta atc tct ttc ttt cag g 3' sense

X3a: 5' ttt tcc caa ggt ttg aac tag c 3' antisense

โดยปฏิกริยา 50 μL ประกอบด้วย 5 μL ของ DNA ที่สกัดได้ 1x Taq buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μM ของแต่ละ primer, และ 1 unit ของ Amplitaq Gold® DNA Polymerase (Applied BioSystems) โดย PCR condition ประกอบด้วย 95 °C 10 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 95 °C 45 วินาที, annealing ที่ 60 °C 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 2 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis จะได้ PCR product ขนาด 659 bp (Sanguansermsri et al. 2001)

นอกจากนี้ยังเตรียม PCR product ที่ครอบคลุมส่วนที่อยู่เหนือ promoter ของยีนเบต้าโกลบินตั้งแต่ -512 จาก cap site โดยมีลำดับเบสของ primer ดังนี้

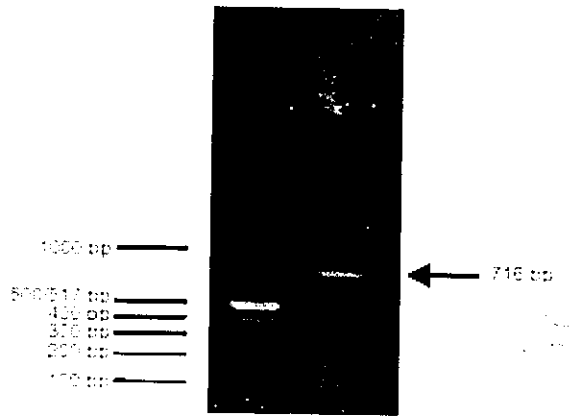
Pro1s: 5' cca gaa ggt ttt aat cca aat a 3' sense

Pro1a: 5' tgt ctc cac atg ccc agt 3' antisense

25 มี.ค. 2548
4910065

โดยปฏิกริยา 50 µL ประกอบด้วย 5 µL ของ DNA ที่สกัดได้ 1x Taq buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM ของแต่ละ primer, และ 1 unit ของ Amplitaq Gold® DNA Polymerase (Applied BioSystems) โดย PCR condition ประกอบด้วย 95 °C 10 นาที ตามด้วย 35 รอบของ touchdown cycle ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่ 95 °C 1 นาที, annealing ที่ 64 °C (ในรอบแรก) 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 1 นาที โดยในแต่ละรอบอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลดลงรอบละ 1 °C จนกระทั่งถึง 49 °C ในรอบที่ 16 หลังจากนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing จะคงที่ที่ 48 °C และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาให้แก่ extension อีก 7 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis จะได้ PCR product ขนาด 719 bp (พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2546) ดังตัวอย่างในรูปที่ 7

จ RC 6481 7.75 กันยา 2548




รูปที่ 7. ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR product ที่มียีนเบต้าโกลบินในส่วนของ promoter ตั้งแต่ -512 bp จาก cap site

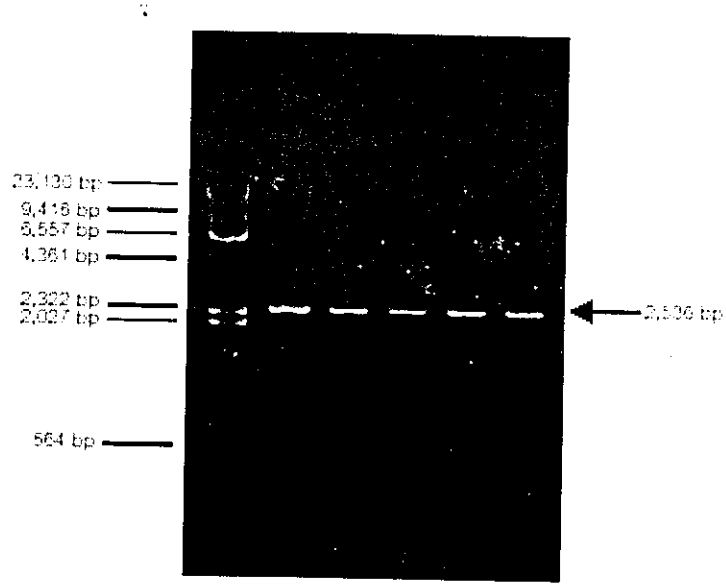
เพื่อให้ชิ้นส่วนของยีนเบต้าโกลบินทั้งหมดอยู่ใน PCR product เดียวกัน ได้ออกแบบ primer ดังนี้

B2536s: 5' tcc caa aac cta ata agt aac 3' sense

B2536a: 5' ctc caa atc aag cct cta c 3' antisense

โดยปฏิกริยา 50 µL ประกอบด้วย 5 µL ของ DNA ที่สกัดได้ 1x Taq buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, 0.4 µM ของแต่ละ primer, และ 5 unit ของ Amplitaq Gold® DNA Polymerase (Applied BioSystems) โดย PCR condition ประกอบด้วย 95 °C 10 นาที ตามด้วย 35 รอบของ touchdown cycle

ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่ 94 °C 2 นาที, annealing ที่ 60 °C (ในรอบแรก) 2 นาที และ extension ที่ 72 °C 5.30 นาที โดยในแต่ละรอบอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลดลงรอบละ 1 °C จนกระทั่งถึง 46 °C ในรอบที่ 15 หลังจากนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing จะคงที่ที่ 46 °C และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาให้แก่ extension อีก 7 นาที เมื่อทดสอบด้วย 2% TBE agarose gel electrophoresis จะได้ PCR product ขนาด 2,536 bp (Sanguansermsri 2004) ดังแสดงในรูปที่ 8




รูปที่ 9. ตัวอย่างภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR product ที่มียีนเบต้าโกลบินทั้งหมด รวมตั้งแต่ -694 bp จนถึง +1842 จาก cap site

**การทำ PCR ให้บริสุทธิ์ก่อนทำการหาลำดับเบส**

PCR product ทั้งหมดถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี silica gel membrane absorption โดย QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) ก่อนเก็บที่ -20 °C ก่อนทำการหาลำดับเบสต่อไป

## เอกสารอ้างอิง


เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์ (2547) ความชุกของอัลฟ่าธาลัสซีเมียวันชนิด Thai deletion ในหญิงตั้งครรภ์ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี ดาวัลย์ ฉิมภู่ และ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี (2546) ไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับเบสของโปรโมเตอร์ของยีนเบต้าโกลบินของมนุษย์ สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13 พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน 5-7 มิถุนายน 2546 มหาวิทยาลัยนเรศวร เท็ก แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด หน้า 266-269.

Forget BG (2001) Molecular mechanisms of beta-thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds) Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge University Press, Cambridge, pp 252-276

Liu YT, Old JM, Miles K, Fisher CA, Weatherall DJ, Clegg JB (2000) Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Br J Haematol 108: 295-9

Makonkawkeyoon L, Sanguansermsri T, Asato T, Nakashima Y, Takei H (1993) Rapid detection of chain termination mutations in the alpha 2 globin gene. Blood 82: 3503-4

Sanguansermsri P (2004) Analysis of 'framework' of common beta-thalassemia mutations in northern Thailand. Ph.D. thesis, Naresuan University

Sanguansermsri T, Phumyu N, Chomchuen S, Steger HF (1999) Screening for Alpha-Thalassemia-1 Heterozygotes in Expecting Couples by the Combination of a Simple Erythrocyte Osmotic Fragility Test and a PCR-Based Method. Community Genet 2: 26-9

Sanguansermsri T, Thanarattanakorn P, Steger HF, Tongsong T, Chanprapaph P, Wanpirak C, Siriwatanapa P, Sirichotiyakul S, Flatz G (2001) Prenatal diagnosis of beta-thalassemia major by high-performance liquid chromatography analysis of hemoglobins in fetal blood samples. Hemoglobin 25: 19-27.

โครงการย่อยที่ 2

# การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดของโรคเบต้าธาลัสซีเมีย

# prenatal diagnosis of β-thalassemia

โดย

ร.ท. หญิง สายศิริ มีระเสน

# โครงการย่อยที่ 2

**ชื่อโครงการ** การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดของโรคเบต้าธาลัสซีเมีย

prenatal diagnosis of β-thalassemia


**หัวหน้าโครงการ**

ร.ท. หญิง สายศิริ มีระเสน

**ที่ปรึกษาโครงการวิจัย**

ศาสตราจารย์เกียรติ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี

**ผู้ร่วมวิจัย** นางสาววิลาวัลย์ มั่นคง


## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดา
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และเบต้าธาลัสซีเมีย/ ฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ก่อนคลอด

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาได้
2. สามารถนำเทคนิคการตรวจยีนธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคในหญิงตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการมีทารกในครรภ์เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีเพื่อลดการทำสูติศาสตร์หัตถการอันอาจมีผลกระทบต่อทารกในครรภ์
3. สามารถนำเทคนิคการตรวจหายีนธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคในคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดทารกที่เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี

## บทนำ

โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมชนิดเรื้อรังที่พบมากที่สุดในประเทศไทย มีอุบัติการณ์สูงและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี จัดเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ โรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่พบมากในคนไทยได้แก่ โฮโมไซกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (homozygous a-thalassemia 1 หรือ Hb Bart's hydrops fetalis), โฮโมไซกัสเบต้าธาลัสซีเมีย หรือ เบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์ (homozygous b-thalassemia หรือ b-thalassemia major), เบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี (b-thalassemia/HbE) จากรายงานทางสถิติพบว่ามีผู้เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียสูงถึงร้อยละ 30-40 ของประชากรไทยและร้อยละ 1 ของประชากรป่วยเป็นโรค ในเขตภาคเหนือพบว่ามีอุบัติการณ์ของโรคเบต้าธาลัสซีเมียสูงถึงร้อยละ 9-10 แต่ละปีจะมีทารกเกิดใหม่ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 60-70 ราย โดยจำแนกเป็นชนิดโฮโมไซกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 20-30 ราย ชนิดโฮโมไซกัสเบต้าธาลัสซีเมีย 20 รายและชนิดเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี 30-40 ราย[3] ชนิดแรกยังไม่มีวิธีการรักษา ทารกจะเสียชีวิตในครรภ์หรือหลังคลอดไม่นานและก่อให้เกิดปัญหาในการดูแลรักษามารดาในแง่ของภาวะแทรกซ้อน ส่วนสองชนิดหลังจะใช้การรักษาแบบประคับประคอง เช่นการให้เลือดทดแทน รวมทั้งยาขับเหล็กเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี การดูแลรักษาเช่นนี้จะทำให้เสียค่าใช้จ่ายประมาณรายละ 1 แสนบาทต่อปี ซึ่งเป็นปัญหาต่อครอบครัวและประเทศชาติทั้งในแง่เศรษฐกิจและสังคม แต่ละปีรัฐต้องใช้งบประมาณในการดูแลผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก จึงถือเป็นนโยบายระดับชาติที่จะต้องป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมีย แนวทางในการแก้ปัญหาโรคธาลัสซีเมียคือ การป้องกันไม่ให้มีทารกเกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียโดยการตรวจคัดกรองหาพาหะในคู่สามีภรรยาเพื่อหาคู่เสี่ยง การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (counseling) การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) ตลอดจนเลือกยุติการตั้งครรภ์ในรายที่ทารกในครรภ์เป็นโรคตามความสมัครใจของคู่สามีภรรยา

การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อโรคธาลัสซีเมียนั้น สามารถเก็บตัวอย่างจากทารกในไตรมาศที่สองของการตั้งครรภ์โดยการเก็บเลือดจากสายสะดือของทารก (cordocentesis) ซึ่งมีอัตราเสี่ยงสูงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่นการติดเชื้อและการแท้ง[4] ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยมีผลกระทบต่อทารกในครรภ์น้อยลงโดยการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอนเอของทารกในครรภ์ (cell-free fetal DNA) ที่ไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดของมารดา (maternal plasma)[5-6] ปริมาณดีเอนเอของทารกในครรภ์ต่อดีเอนเอของมารดาที่อยู่ในน้ำเลือดของช่วงอายุครรภ์ไตรมาศแรกมีค่าร้อยละ 3.4 และ 6.2 ในไตรมาศที่สาม โดยเฉลี่ยมีปริมาณดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่ไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดมารดาในอายุครรภ์ไตรมาศแรก (11 –17 สัปดาห์) จำนวน 25.4 copies ต่อปริมาตรน้ำเลือดมารดา 1 มิลลิลิตร[7] และจะมีค่าเพิ่มขึ้นในไตรมาศที่สองและสามตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดของมารดาจะถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาหลังคลอดเพียงไม่กี่นาที[8] ปัจจุบันได้นำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อหาความผิดปกติทาง

พันธุกรรมแบบ sex-linked genetic disorders, fetal rhesus D status[9-11], autosomal dominant genetic disorders และ autosomal recessive genetic disorders[12-16], การตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม[17] และการตรวจเพศของทารกในครรภ์[11, 18-20]

โรคโฮโมไซกัสเบต้าธาลัสซีเมียหรือเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์เป็นโรคโลหิตจางชนิดร้ายแรงเกิดจากมิวเตชั่นของยีนเบต้าโกลบินในโครโมโซมคู่ที่ 11 ทำให้มีการสังเคราะห์สายเบต้าโกลบินลดลง ($b^+$-thalassemia) หรือไม่มีการสังเคราะห์เลย ($b^0$-thalassemia) มิวเตชั่นของยีนเบต้าโกลบินที่พบในประเทศไทยแสดงไว้ในตารางที่ 1[21-22] มิวเตชั่นในภาคเหนือที่พบมากคือที่ตำแหน่ง codons 41/42 (-CTTT) 39.8%, codon 17 (A->T) 39.8%, -28 (A->G) 3.5%, IVS-I #5 (G->C) 2.8% และ IVS-II #654 (C->T) 1.4% ส่วนโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีจัดอยู่ในกลุ่มเบต้าธาลัสซีเมียอินเทอร์มีเดียตพบมากในภาคเหนือของไทยมีความรุนแรงของโรคต่างกันไป เกิดจากความผิดปกติของยีนฮีโมโกลบินอีที่ตำแหน่ง codon 26 (G->A) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดไร้เสถียรภาพ เมื่อไปรวมกับยีน $b^0$-thalassemia ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ ผู้ป่วยจะมีภาวะโลหิตจาง ซีด อ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย ตาเหลือง ตัวเหลือง ดับม้ามโต การเจริญเติบโตช้า มีการเปลี่ยนแปลงของใบหน้า การรักษาต้องได้รับการให้เลือดเป็นประจำทุกเดือนและยาขับเหล็กอย่างน้อย 5 วันต่อสัปดาห์ทำให้ผู้ป่วยต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก และมักเสียชีวิตก่อนเวลาอันควร[23]

**ตารางที่ 1** ชนิดการกลายพันธุ์ในระดับโมเลกุลของสายเบต้าโกลบินที่พบในประเทศไทย[21-22]

| ชนิดของความผิดปกติในระดับโมเลกุลในสายเบต้าโกลบิน | ความถี่ (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ภาคใต้ | ภาคกลาง | ภาคเหนือ | ภาคอีสาน |
| -88 (C->T) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| -86 (C->G) | 0 | 0.5 | 0 | 0 |
| -28 (A->G) | 5.7 | 9.3 | 3.5 | 1.6 |
| CAP site (A->C) | 0.4 | 0 | 0 | 0 |
| Codons 8/9 (+G) | 0.4 | 0 | 0 | 0 |
| Codons 14/15 (+G) | 0 | 0.3 | 0 | 0 |
| Codon 15 (G->A) | 0.4 | 0 | 0 | 0 |
| Codon 15 (-T) | 0 | 0.3 | 0 | 0 |
| Codon 16 (-C) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Codon 17 (A->T) | 11.3 | 16.5 | 39.8 | 29.5 |
| Codon 19 (A->G) | 15.2 | 2.9 | ND | 0 |
| Codon 26 (G->T) | 0 | ND | 0 | 1.6 |
| IVS1 #1 (G->A) | 0.4 | 0 | 0 | 0 |
| IVS1 #1 (G->T) | 6 | 1.3 | ND | 1.6 |
| IVS1 #5 (G->C) | 18.8 | 4.3 | 2.8 | 0 |
| Codon 35 (C->A) | 0 | 2.7 | 0 | 0 |
| Codon 35 (-C) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Codon 41 (-C) | 1.4 | 0.8 | ND | 0 |
| Codon 41/42 (-CTTT) | 30.1 | 41.6 | 39.8 | 37.7 |
| Codon 43 (G->T) | 0 | 0.8 | 0 | 0 |
| Codons 71/72 (+A) | 0 | 2.1 | 0 | 13.1 |
| IVS-II #654 (C->T) | 2.1 | 8 | 1.4 | 9.8 |
| 105 bp deletion | 0.4 | 0 | 0 | 0 |
| 619 bp deletion | 0 | 1.1 | 0 | 0 |
| 3.5 kb deletion | 4.3 | 1.1 | ND | ND |

ND = not determined

โรคเบต้าธาลัสซีเมียมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive ในมารดาที่เคยมีบุตรเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียมักมีโอกาสที่จะมีบุตรเป็นโรคดังกล่าวได้ถึงร้อยละ 25 ของการตั้งครรภ์แต่ละครั้ง จึงมีความจำเป็นในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดเพื่อควบคุมป้องกันทารกที่จะเกิดมาเป็นโรคดังกล่าว เทคนิคการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในปัจจุบันคือ การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้าโกลบินโดยการวิเคราะห์ดีเอนเอด้วยวิธี gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis, Amplification Refractory Mutation System (ARMS), Allele Specific Oligonucleotide (ASO) hybridization, Reverse Dot Blot (RDB) hybridization, direct DNA sequencing, การตรวจชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี electrophoresis และการวิเคราะห์การสังเคราะห์สายโกลบิน (globin chain synthesis) โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)[23-26]

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียและเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีในการวิจัยนี้คือ Amplification Refractory Mutation System (ARMS)[23] ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหามิวเตชั่นโดยออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อมิวเตชั่นชนิดนั้นๆ รวมทั้งปรับปรุงสภาวะต่างๆ ของเทคนิค PCR ให้เหมาะสม จากนั้นจึงทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิคนี้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์ที่มีมิวเตชั่นที่ตำแหน่ง codons 41/42 (-CTTT), codon 17 (A->T) และผู้ป่วยโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่มีมิวเตชั่นที่ตำแหน่ง codon 26 (G->A) จำนวน 10 ราย รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคนี้ไปตรวจวินิจฉัย จากนั้นจึงดำเนินการตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีในหญิงตั้งครรภ์ที่เสี่ยงต่อการมีทารกเป็นโรคดังกล่าวจำนวน 20 ราย โดยเปรียบเทียบผลกับการตรวจเลือดจากสายสะดือทารกด้วยเทคนิค direct DNA sequencing เพื่อประเมินผลการตรวจ วินิจฉัยแยกโรคของทารกในครรภ์ที่ไม่เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีในคู่เสี่ยงเพื่อลดการทำสูติศาสตร์หัตถการอันอาจมีผลกระทบต่อทารกในครรภ์ลงได้

## 10. ระเบียบวิธีการวิจัย

### การเก็บเลือดจากกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างคือหญิงตั้งครรภ์และสามีที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการให้กำเนิดทารกเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

<u>เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าศึกษา</u>

- หญิงตั้งครรภ์และสามีที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
- หญิงตั้งครรภ์ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะของโรคเบต้าธาลัสซีเมียและสามีเป็นพาหะฮีโมโกลบินอี
- หญิงตั้งครรภ์อายุครรภ์ประมาณ 18-22 สัปดาห์
- หญิงตั้งครรภ์และสามีลงนามยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย

เกณฑ์ในการคัดออกจากการวิจัย

- หญิงตั้งครรภ์ที่อายุครรภ์เกิน 22 สัปดาห์
- หญิงตั้งครรภ์ที่ไม่ได้เป็นโรคหรือเป็นพาหะของโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และ/หรือสามีไม่ได้เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี
- หญิงตั้งครรภ์ที่คิดว่าไม่สามารถนำสามีมาตรวจเลือดได้ ตัวอย่างเช่น สามีเสียชีวิต สามีไปทำงานต่างประเทศ หรืออยู่ต่างจังหวัดซึ่งไม่สามารถมารับการตรวจเลือดได้

การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดา จึงทำการศึกษาในหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นโรคหรือพาหะของโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และสามีที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีจำนวน 20 คู่ในเบื้องต้น อย่างไรก็ตามในระหว่างการศึกษานี้เมื่อมีหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยก็จะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคนี้มาใช้ตรวจวินิจฉัยแยกโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

ขั้นตอนการดำเนินงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือขั้นตอนการพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดา และขั้นตอนการศึกษาความน่าเชื่อถือและความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ก่อนคลอด

10.1 หญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่หน่วยฝากครรภ์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการให้กำเนิดทารกเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีจะได้รับการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมเรื่องโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียตามแนวทางของกระทรวงสาธารณสุขและจะขอคำยินยอมจากหญิงตั้งครรภ์และสามีในการเจาะเลือดเพื่อนำมาพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาตั้งแต่การมาฝากครรภ์ครั้งแรก โดยพยายามคัดหญิงตั้งครรภ์ที่คิดว่าไม่สามารถนำสามีมาตรวจเลือดได้ออกจากการวิจัย เพื่อให้ได้ข้อมูลคู่เสี่ยงที่ครบถ้วน

ตัวอย่างเลือดของหญิงตั้งครรภ์จะนำมาปั่นแยกน้ำเลือดก่อน แล้วจึงสกัดดีเอนเอจากเลือดของหญิงตั้งครรภ์และสามีด้วยชุดสกัดดีเอนเอ QIAamp Blood DNA mini kit (Qiagen) จากนั้นจึงนำดีเอนเอ (genomic DNA) ที่ได้ของหญิงตั้งครรภ์และสามีมาตรวจหาชนิดของยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีด้วยวิธี ARMS ส่วนดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่ปะปนในน้ำเลือดมารดา (fetal DNA in maternal plasma) นั้นมีปริมาณน้อยมากจึงต้องอาศัยเทคนิค Nested PCR โดยเพิ่มปริมาณดีเอนเอของทารกในครรภ์ให้มากขึ้นโดยทำ PCR ที่บริเวณ exon I-II ซึ่งครอบคลุมมิวเตชั่นทั้ง 4 ชนิดที่ต้องการตรวจก่อน จากนั้นจึงนำดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีด้วยวิธี ARMS ต่อไป

10.2 การศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี โดยประสานงานกับสูติแพทย์ของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ กรณีได้รับคำยินยอมจากคู่เสี่ยงเพื่อเจาะเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ (cordocentesis) มาตรวจด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน จากนั้นจึงนำผลมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจหายีนดังกล่าวของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดา กรณีที่ผลการตรวจไม่ตรงกันจะพิจารณาทำการตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีเพื่อยืนยันการตรวจวินิจฉัยต่อไป

10.3 การตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีในคู่เสี่ยง ภายหลังจากได้รับคำยินยอมจากคู่เสี่ยงที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อเจาะเลือดและนำมาตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ก่อนคลอดด้วยวิธีดังกล่าว ในกรณีที่ตรวจพบยีนดังกล่าวของทารกในครรภ์จะทำการประสานงานกับสูติแพทย์เพื่อขอคำยินยอมจากคู่เสี่ยงมาเจาะเลือดจากสายสะดือทารก (cordocentesis) มาตรวจวินิจฉัยอีกครั้งหนึ่ง ในกรณีที่ทารกในครรภ์เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ทางสูติแพทย์จะให้คำปรึกษาและขอความเห็นจากคู่เสี่ยงเพื่อพิจารณายุติการตั้งครรภ์ ส่วนในรายที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคดังกล่าว จะถูกคัดแยกออกไปโดยไม่ต้องทำสูติศาสตร์หัตถการอันอาจมีผลกระทบต่อทารกในครรภ์ได้ ซึ่งเป็นการช่วยลดความเสี่ยงลงได้ถึงครึ่งหนึ่งของหญิงตั้งครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

**11. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย 2 ปี**

1 มิถุนายน 2546- 30 พฤษภาคม 2548

ขั้นตอนในการดำเนินงานเพื่อตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์ และโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีโดยการตรวจยีนธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ที่ปะปนอยู่ในน้ำเลือดมารดา

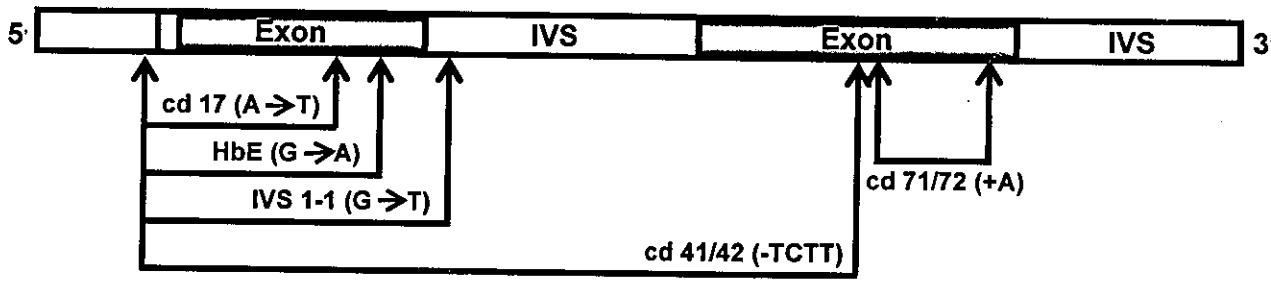
| การดำเนินงาน | 2545 | 2546 | | 2547 | | 2548 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | มิ.ย.-ธ.ค. | ม.ค.-มิ.ย. | ก.ค.-ธ.ค. | ม.ค.-มิ.ย. | ก.ค.-ธ.ค. | ม.ค.-มิ.ย. |
| 1. การขออนุมัติวิจัยในมนุษย์ | ← | | | | | |
| 2. การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิค ARMS | | ← | | | | |
| | | ← | → | | | |
| 3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจแยกโรค | | | | ← | → | |
| | | | | | ← | → |
| 4. การวินิจฉัยแยกโรคในคู่เสี่ยง | | | | | | |
| 5. การวิเคราะห์ข้อมูล | | | | | | |
| 6. การรายงานผล | | | | | | |

## 12. ผลการวิจัย

### 1. การพัฒนาเทคนิค ARMS เพื่อตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอี

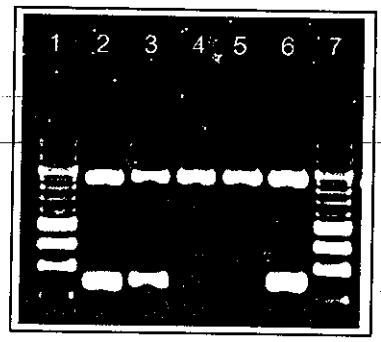
เนื่องจากมิวเตชันที่ทำให้เกิด $b^0$-thalassemiaในเขตภาคเหนือ มีอยู่ 4 ชนิดคือ มิวเตชันที่ codons 41/42 (-TCTT), codon 17 (A->T), IVS1 #1 (G->T) และ codons 71/72 (+A) คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการตรวจมิวเตชั่นของยีนเบต้าธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค Amplification Refractory Mutation System (ARMS) โดยออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อมิวเตชันทั้ง 4 ชนิด โดยให้เบสที่ทำให้เกิดมิวเตชันนั้นอยู่ทางปลายด้าน 3' ของ primer แต่ละตัว และให้ขนาดของ PCR product ทั้ง 4 ชนิดที่แตกต่างกัน

ดังแผนภาพที่ 1



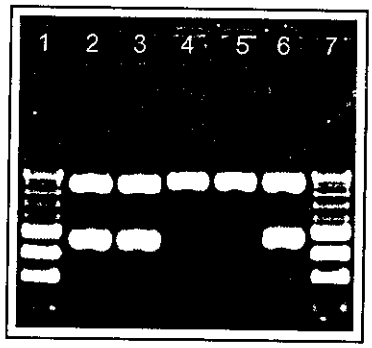

**ภาพที่ 1** ตำแหน่ง primers ที่ใช้ตรวจหายีนเบตาธาลัสซีเมียทั้ง 4 ชนิดโดยเทคนิค ARMS

การตรวจหายีนที่มีมิวเตชันชนิด codon 17(A → T) ด้วยเทคนิค ARMS




| | | |
|---|---|---|
| 1, 7 | = | 100 bp DNA Ladder |
| 2, 3 | = | มีมิวเตชันชนิด cd17 |
| 4, 5 | = | ไม่มีมิวเตชันชนิด cd 17 |
| 6 | = | Positive control |
| 861 bp | = | Internal positive control |
| 251 bp | = | cd 17 (A → T) mutation |

การตรวจหายีนที่มีมิวเตชันชนิด codons 41/42 (-TCTT) ด้วยเทคนิค ARMS




| | | |
|---|---|---|
| 1, 7 | = | 100 bp DNA Ladder |
| 2, 3 | = | มีมิวเตชันชนิด cd41/42 |
| 4, 5 | = | ไม่มีมิวเตชันชนิด cd 41/42 |
| 6 | = | Positive control |
| 861 bp | = | Internal positive control |
| 454 bp | = | cd41/42 (-TCTT) mutation |

การตรวจหายีนที่มีมิวเตชันชนิด codons 71/72(+A) ด้วยเทคนิค ARMS

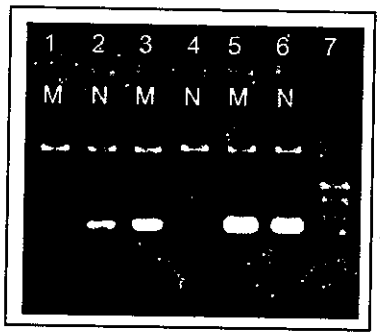
| | | |
|---|---|---|
| 1 | = | 100 bp DNA Ladder |
| 2 | = | มีมิวเตชันชนิด cd 71/72 |
| 3 | = | ไม่มีมิวเตชันชนิด cd 71/72 |
| 861 bp | = | Internal positive control |
| 241 bp | = | codons 71/72(+A) mutation |

การตรวจหายีนที่มีมิวเตชันชนิด IVS 1#1 (G → T) ด้วยเทคนิค ARMS

| | | |
|---|---|---|
| 1 | = | 100 bp DNA Ladder |
| 2 | = | มีมิวเตชันชนิด IVS1#1 |
| 3 | = | ไม่มีมิวเตชันชนิด IVS 1#1 |
| 861 bp | = | Internal positive control |
| 292 bp | = | IVS 1#1 (G → T) mutation |

การตรวจหายีน Hemoglobin E (G → A) ด้วยเทคนิค ARMS

ในการตรวจหายีนฮีโมโกลบินอีจะใช้ primers 2 ชุดซึ่งออกแบบให้วางตรงตำแหน่งโคดอนที่ 26 บนยีน b-globin โดยชุดแรกเป็น primer ที่จำเพาะกับยีนฮีโมโกลบินอี (AAG) อีกชุดหนึ่งเป็น primer ที่จำเพาะกับยีนปกติ (GAG) ซึ่งต่างก็ให้ PCR product มีขนาดเท่ากัน (276 bp) จึงจำเป็นต้องทำ PCR 2 หลอดโดยแยก primer สำหรับตรวจทั้ง 2 ยีนไว้คนละหลอด ฉะนั้นในการอ่านผลจะต้องอ่านทั้ง 2 หลอดคู่กัน ถ้าในตัวอย่างนั้นให้ผลบวกทั้งใน primer ที่จำเพาะกับยีนทั้งสอง แสดงว่าเป็น heterozygous HbE ถ้าให้ผลบวกในหลอดที่มี primer ที่จำเพาะกับยีนปกติ แสดงว่าเป็น normal ถ้าให้ผลบวกในหลอดที่มี primer ที่จำเพาะกับยีนฮีโมโกลบินอี แสดงว่าเป็น homozygous HbE ดังรูป

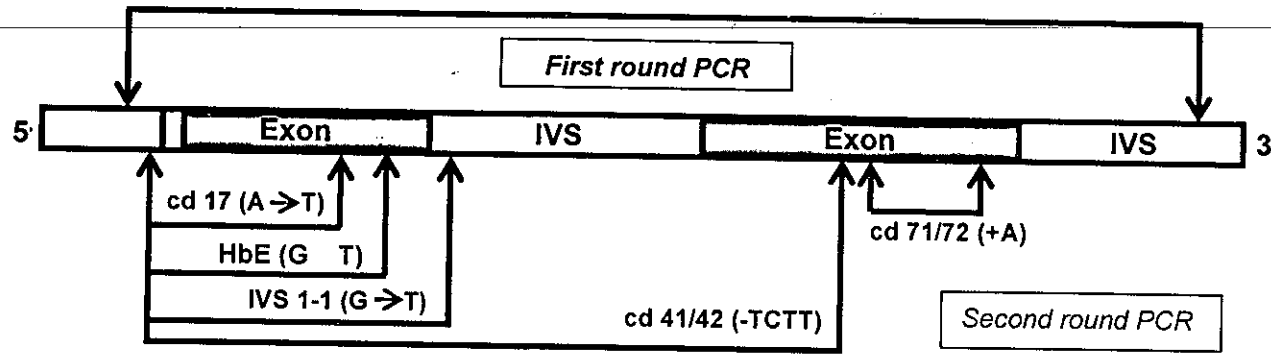



| | | |
|---|---|---|
| 1-2 | = | Normal |
| 3- 4 | = | HomozygousHbE |
| 5- 6 | = | Heterozygous HbE |
| 7 | = | 100 bp DNA Ladder |
| 861 bp | = | Internal positive control |
| 276 bp | = | Hemoglobin E หรือ codon 26 (G → A) |

2. **การพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดา**

เนื่องจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่ปะปนในน้ำเลือดมารดามีปริมาณน้อยมากจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่อยู่ในน้ำเลือดมารดาให้มากขึ้นโดยออกแบบ primer ให้วางที่บริเวณ exon I-II ของยีน b-globin ซึ่งครอบคลุมมิวเตชันทั้ง 4 ชนิด แล้วจึงนำดี

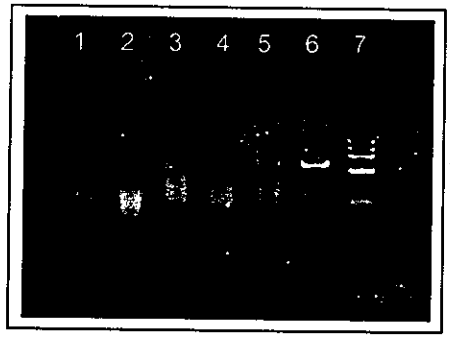
เอนเอของทารกในครรภ์ที่เพิ่มปริมาณแล้วมาทำ Second round PCR เพื่อตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีด้วยเทคนิค ARMS ต่อไป ดังแผนภาพที่ 2




**แผนภาพที่ 2** การทำ Nested PCR เพื่อตรวจหายีนเบตาธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์จากน้ำเลือดมารดา

First round PCR :

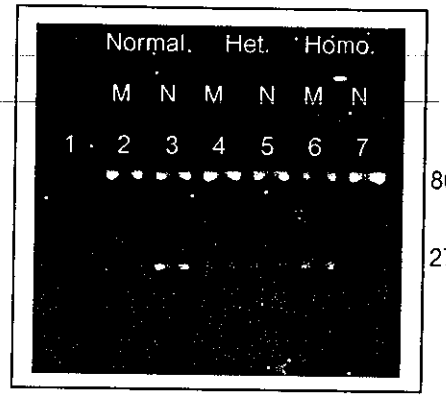
การเพิ่มปริมาณดีเอนเอของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาที่บริเวณ Exon I-II บน b-globin gene




| | | |
|---|---|---|
| 1-6 | = | Amplified DNA in plasma |
| 7 | = | 100 bp DNA Ladder |

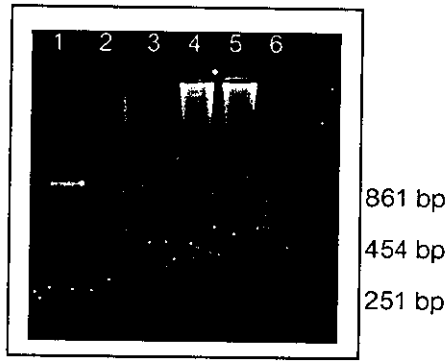
Second round PCR :

การตรวจหายีน HbE ของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาโดยเทคนิค ARMS




1 = 100 bp DNA ladder
2-3 = normal
4-5 = Heterozygous HbE
6-7 = Homozygous HbE

การตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมียของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาโดยเทคนิค ARMS



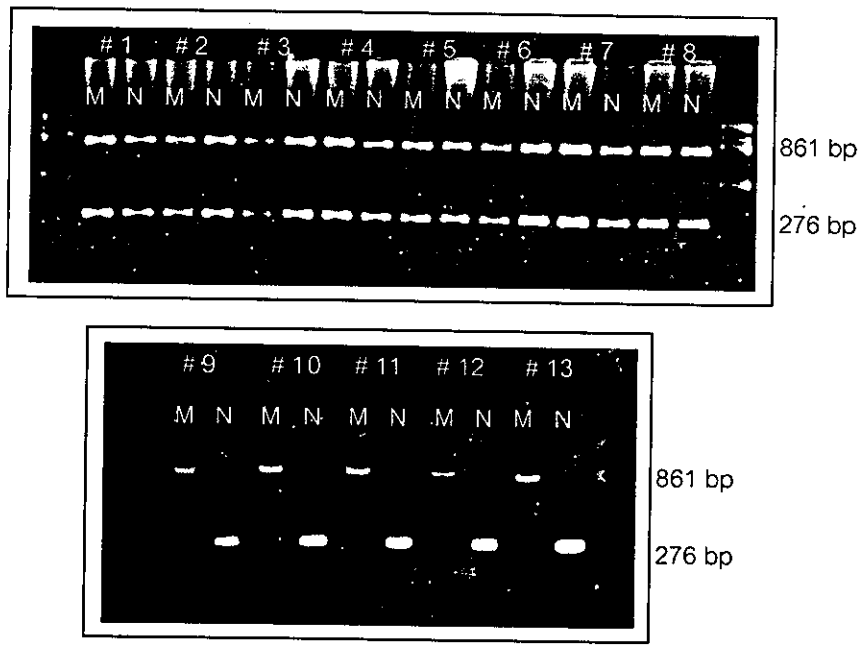

1 = 100 bp DNA ladder
2 = positive for codons 41/42 mutation
3 = positive for codon 17 mutation
4-6 = negative for β-thalassemia

3. การศึกษาความน่าเชื่อถือและความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์และโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ก่อนคลอด

ในขั้นตอนนี้เป็นการนำผลการวิเคราะห์ปริมาณการสร้างฮีโมโกลบินของทารกในครรภ์ (fetal hemoglobin typing) ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากเลือดสายสะดือของทารกในครรภ์ (cordocentesis) มาตรวจด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน จากนั้นจึงนำผลมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจหายีนดังกล่าวของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดา กรณีที่ผลการตรวจไม่ตรงกันจะพิจารณาทำการตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีเพื่อยืนยันการตรวจวินิจฉัยต่อไป

จากการตรวจหายีนฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดของหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงจำนวน 13 ราย พบว่า สามารถตรวจพบยีนฮีโมโกลบินอีในน้ำเลือดของหญิงตั้งครรภ์จำนวน 8 รายและอีก 5 ราย ตรวจไม่พบยีนฮีโมโกลบินอีในน้ำเลือด และสามารถตรวจพบยีนเบตาธาลัสซีเมียที่มีมิวเตชันชนิด codon41/42 จำนวน 2 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณการสร้างฮีโมโกลบินของทารกในครรภ์ (fetal hemoglobin typing) ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่ามีทารกในครรภ์ป่วยเป็นโรค $b^0$-thalassemia/HbE จำนวน 1 รายซึ่งได้ทำการยุติการตั้งครรภ์ไปเรียบร้อยแล้ว มีทารกในครรภ์เป็น heterozygous Hb E จำนวน 7 ราย เป็น heterozygous $b^0$-thalassemia จำนวน 1 รายและอีก 4 รายเป็นปกติ จะเห็นว่าเทคนิคการตรวจหายีนดังกล่าวจากดีเอนเอของทารกในครรภ์ที่ปะปนอยู่ในน้ำเลือดมารดาให้ผลตรงกันกับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดที่ใช้กันในปัจจุบัน ซึ่งทางคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาในจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มากกว่านี้เพื่อประเมินถึงความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคการตรวจยีนฮีโมโกลบินอีไปใช้ตรวจวินิจฉัยแยกโรค $b^0$-thalassemia/HbE ในหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด เพื่อลดการทำสูติศาสตร์หัตถการในรายที่ตรวจไม่พบยีนของฮีโมโกลบินอีในน้ำเลือดของหญิงตั้งครรภ์นั้น

การตรวจหายีน HbE ของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาโดยเทคนิค ARMS




การตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมียของทารกในครรภ์ในน้ำเลือดมารดาโดยเทคนิค ARMS

| | | |
|---|---|---|
| 1 | = | 100 bp DNA ladder |
| 4,5 | = | positive for codons 41/42 mutation |
| 2,3,6 | = | negative for β-thalassemia |

## 13. การเสนอผลงานวิชาการ

**ในการประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13 เรื่องพันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน ในระหว่างวันที่ 5-7 มิถุนายน 2546 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 2 เรื่องคือ**

1. การใช้เทคนิค ARMS เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบต้าธาลัสซีเมีย
2. การตรวจวินิจฉัยแยกโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีโดยการตรวจยีนฮีโมโกลบินอีของทารกในครรภ์ที่ปะปนอยู่ในน้ำเลือดมารดา

## 14. เอกสารอ้างอิง


1. รายงานทางวิชาการ คณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญโรคเลือด. สถานการณ์ปัจจุบันและกลวิธีในการป้องกันและควบคุมโรคเลือดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: นำอักษรการพิมพ์, 2533:11
2. วิชัย เทียนถาวร, จินตนา พัฒนาพงศ์ธร. รายงานการประชุม โครงการป้องกันและควบคุมโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย กองโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค สิงหาคม 2544 หน้า 1-2
3. รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 8.ขอนแก่น: โรงพิมพ์ชุนนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, 2545:24
4. Tabor A, Philip J, Madson M, Bang J, Obel EB, Norgaard-Pedersen B. Randomised controoled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. Lancet 1986;1:1287-93
5. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997;350:485-87
6. Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma. Ann NY Acad Sci USA 2000;906:204-13
7. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM, Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998;62:768-75

8. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999;64:218-24

9. Lo YMD, Bowell PJ, Selinger M, MacKenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MDG, Littlewood TJ. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. Lancet 1993;341:1147-48

10. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murrphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998;339:1734-38

11. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. Br J Gynecol 2000;107:766-69

12. Lo YMD, Flemming KA, Wainscoat JS. Strategies for the detection of autosomal fetal DNA sequence from maternal peripheral blood. Ann NY Acad Sci USA 1994;731:204-13

13. Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primignani P, Caligaris CF, Saglio G. Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. Blood 1990;75:2102-6

14. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YMD. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. Clin Chem 1999;45:2033-35

15. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of Myotonic Dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000;46:301-2

16. Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W. Prenatal identification of fetal genetic traits. Lancet 2001;357:310-11

17. Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes S, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. Clin Chem 1999;45:1747-51

18. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. Clin Chem 2001;47:41-46

19. Sekikawa A, Kondo T, Iwasaki M, WatanabeA, Jimbo M, Saito H, Okai T. Accuracy of fetal gender determination by analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2001;47:1856-58

20. Rijnders RJ, Schoot CE van der, Bossers B, Vroede MA de, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. Obstet Genycol 2001;98:374-7

21. Huisman YHJ. The b- and d-thalassemia repository (ninth edition; Part I). Hemoglobin. 1998; 22(2):169-195.

22. Thalassemia Foundation of Thailand. Beta thalassemia [Online]. Available: http//www.thal.psu.ac.th/thai/beta.html [2002, February 9].

23. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี. ธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง การรักษา การควบคุมและป้องกัน พิมพ์โดย ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2543

24. จินตนา ศิรินาวิน, วันชัย วนะชิวนาวิน, วรวรรณ ตันไพจิตร, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์. ธาลัสซีเมีย สำหรับเวชปฏิบัติกรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน, 2544

25. ปราณี (วินิจจะกูล) ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ. ธาลัสซีเมีย: การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR พิมพ์โดยโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541

26. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed, Oxford: Blackwell Science, 2001

27. QIAamp DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook. Hilden, Germany:Qiagen, 1999

28. Thein SL, Wanichagoon P, Hesketh C, Best S, Fucharoen S, Wasi P, Weatherall DJ. The molecular basis of b-thalassemia in Thailand: Application to prenatal diagnosis. Am J Genet 1990;47:369-75

29. Losekoot M, Fodde R, Harteveld CL, van Heeren H, Gioradano PC, Bernini LF. Denaturating genomic DNA: A rapid and reliable diagnostic approach to b-thalassemia. Br J Hematol 1990;76:269-74

30. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-67

31. Tammry H, Surrey S, Kirschmann H, Shalmon L, Zaizov R, Schwartz E, Rappaport EF. Systematic use of automated fluorescence-based sequence analysis of amplified genomic DNA for rapid detection of point mutation. Am J Hematol 1994;46:127-33

32. ABI PRISM DNA sequencing: Chemistry guides. Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA:1995:1-3

โครงการย่อยที่ 3

# โครงการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย

Thalasemia Counselling Programme .

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่

# โครงการย่อยที่ 3

**ชื่อโครงการ** **โครงการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย**
Thalasemia Counselling Programme .

**หัวหน้าโครงการ** รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่

**ที่ปรึกษาโครงการวิจัย** :
ศาสตราจารย์เกียรติ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี
รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี

**ผู้ร่วมวิจัย**
1. ดร. สุธิรา เลิศตระกูล
2. ดร. จิราภรณ์ โตจรัส

**ประเภทของงานวิจัย** : การวิจัยและพัฒนา

**สาขาวิชาที่ทำวิจัย** : สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

## วัตถุประสงค์

การตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชนโดยเฉพะหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากท้องในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ :

ประชาชนโดยเฉพะหญิงตั้งครรภ์ ที่มาฝากท้องในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือ จะมีความเข้าใจเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย ดังนี้

1 โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคที่รักษาไม่หาย ต้องรักษาตลอดชีวิต และมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

2 พ่อ และแม่ ที่ดูเป็นปกติ (เป็นพาหะ)สามารถมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย ได้

3. แต่พ่อ และแม่ ที่ดูเป็นปกติ (เป็นพาหะ)มีโอกาสคัดเลือกเฉพาะลูก ที่ไม่เป็นโรคได้ ทำให้ลดจำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรค

**บทนำ**

โรคธาลัสซีเมียที่พบบ่อยและเป็นปัญหาทางการแพทย์ที่สำคัญในประเทศไทยมี ทั้งชนิด $\alpha$-ธาลัสซีเมีย และ $\beta$-ธาลัสซีเมีย เนื่องจากยีนธาลัสซีเมียมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบลักษณะด้อย(autosomal recessive ) ฉะนั้นผู้ที่มียีนผิดปกติเพียงยีนเดียวจึงเป็นเพียงพาหะของโรคเท่านั้น โดยผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียต้องได้รับยีนธาลัสซีเมียที่อยู่บนตำแหน่ง(locus) เดียวกันบนโครโมโซมที่คู่กันอย่างน้อย 2 ยีน หรือได้รับยีนธาลัสซีเมียร่วมกับยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดที่โกลบินเหมือนยีนธาลัสซีเมีย ด้วยโรคนี้เป็นโรคพันธุกรรมที่ไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาดได้(ยกเว้นวิธีการปลูกถ่ายไขกระดูกใหม่) การรักษาที่เป็นแบบมาตรฐานคือการให้เลือดและยาขับเหล็กรวมทั้งความพยายามในการรักษาโดยวิธีอื่นๆบ้างซึ่งวิธีการเหล่านี้ล้วนต้องมีค่าใช้จ่ายสูงมาก ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีประชากรที่มียีนธาลัสซีเมียและมีฮีโมโกลบินผิดปกติแพร่กระจายอยู่มากจึงเป็นไปได้ยากที่

ปัจจุบันประชาชนชาวไทยเริ่มมีความรู้เกี่ยวกับโรคนี้มากขึ้น และต้องการได้การบริการที่ดีขึ้น ปัญหาของโรคนี้มากเกินกว่าจะตั้งรับอย่างเดียว แต่จะต้องมีแผนเชิงรุก เพื่อป้องกันและควบคุม หนทางที่ดีที่สุดในการป้องกันและควบคุมโรคนี้จะต้องประกอบด้วย 2 แนวทาง และต้องทำพร้อมกันดังนี้ คือ 1. หาทางรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด และ 2. หาทางลดจำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรคนี้ให้เหลือน้อยที่สุดหรือไม่มีผู้เกิดใหม่ที่เป็นโรคนี้เลย และที่สำคัญจะขาดไม่ได้คือการตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชน

ตลอด 30 ปีที่ผ่านมาได้มีความพยายามให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์โดยหวังผลว่าคู่รักที่เป็นพาหะทั้งคู่จะไม่แต่งงานกัน หรือการให้คำแนะนำแก่ผู้ที่สมรสกันแล้วและยังไม่มีลูกหรือเคยมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียแล้ว โดยหวังว่าคู่สมรสจะงดการมีลูก ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการที่ไม่ได้ผล มีเพียงวิธีการเดียวที่ได้รับการตอบรับอย่างดีคือการเพิ่มทางเลือกใหม่ ให้คู่สมรสได้มีโอกาสคัดเลือกเฉพาะลูก

ฉะนั้นคณะผู้วิจัยหวังผลว่างานวิจัยนี้จะช่วยให้การป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมียได้ผลดีขึ้น โดยผู้ที่เป็นโรคได้รับการรักษาดีขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อผู้ป่วยตายหมด การป้องกันโรคดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว จะไม่มีผู้ป่วยโรคนี้อีก

**ผลกระทบเชิงเศรษฐกิจ สังคม และ สิ่งแวดล้อม**

มีประชาชนชาวไทยมากกว่า 600,000 คนที่ไม่สามารถใช้ชีวิตได้อย่างคนปกติต้องทนทุกขเวทนาด้วยโรคธาลัสซีเมีย พ่อแม่ ญาติและคนในครอบครัว ต้องลำบากและทุกขเวทนามากกว่าเพราะสงสารลูก นอกจากนี้การรักษาที่ทำได้ขณะนี้คือการให้เลือดและยาขับเหล็กตลอดชีวิตซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เป็นการเพิ่มภาระกดดันทางเศรษฐกิจอย่างยิ่งสำหรับคนจน เมื่อผู้ป่วยตายลง (อายุ~29ปี)หลังจากก่อความผูกพันในฐานะ พ่อ-แม่-ลูก มานาน จะเป็นโศกนาฏกรรมสำหรับครอบครัวที่มีลูกเป็นโรคนี้ จะเห็นได้ว่าโรคธาลัสซีเมีย นอกจากจะเป็นปัญหาทางสาธารณสุขแล้วยังเป็นปัญหา เศรษฐกิจและสังคมของประเทศ ด้วย

**ขอบเขตการวิจัย**

ปัจจุบันประชาชนชาวไทยเริ่มมีความรู้เกี่ยวกับโรคนี้มากขึ้น แต่ก็เฉพาะในกรุงเทพฯและเขตปริมณฑล สำหรับในต่างจังหวัดมีไม่ถึงร้อยละ1 ที่รู้เรื่องโรคร้ายนี้ และผู้ป่วยจำนวนมากอยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จึงเป็นไปได้ยากที่ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาอย่างทั่วถึง อีกทั้งปัญหาของโรคนี้มากเกินกว่าจะตั้งรับอย่างเดียว แต่จะต้องมีแผนเชิงรุก เพื่อป้องกันและควบคุม หนทางหนึ่งที่ควรทำในการป้องกันและควบคุมโรคนี้คือ การตั้งหน่วยให้คำปรึกษาและแนะนำอันตรายจากโรคนี้แก่ประชาชนภาคเหนือโดยเฉพาะ คู่สมรสที่มีอัตราเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย จึงจำเป็นต้องทำ ควบคู่ไปกับการรักษาผู้ป่วย

**แผนการดำเนินงาน ขอบเขต และแผนการดำเนินงาน**

13.1 พื้นที่ที่ทำการวิจัย

13.2แผนการดำเนินงาน

**พื้นที่ที่ทำการวิจัย**

(i) โรงพยาบาลประจำจังหวัดในเขตภาคเหนือ

(ii) ศูนย์อนามัยแม่และเด็กในเขตภาคเหนือ

(iii) ศูนย์สาธารณสุขชุมชนในเขตภาคเหนือ

**แผนการดำเนินงาน ปีที่ 1**

**วิเคราะห์ปัญหา** จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าประชาชนในเขตภาคเหนือ มากกว่าร้อยละ 98 ไม่ทราบว่าโรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคพันธุกรรมที่รักษาไม่หายและพ่อ และแม่ ที่ดูเป็นปกติ (เป็นพาหะ) สามารถมีบุตรเป็นโรคนี้ได้

**แนวทางการแก้ปัญหาและแผนการดำเนินงาน**

1. รวบรวมความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมีย และเขียนบท (Script)

2.จัดทำแผ่นพับเรื่องโรคธาลัสซีเมีย

3.ประสานงานกับ โรงพยาบาลประจำจังหวัดในเขตภาคเหนือ ศูนย์อนามัยแม่และเด็กในเขตภาคเหนือ และ ศูนย์สาธารณสุขชุมชนในเขตภาคเหนือ เพื่อเผยแพร่ความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมีย

4.ประสานงานกับ วิทยุมหาวิทยาลัยนเรศวร และโทรทัศน์ช่อง 11เพื่อเผยแพร่ความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมีย เป็นประจำเดือน

5.วิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผล

ผลการดำเนินงาน

จากการสำรวจพบว่า ประชาชนโดยเฉพะหญิงตั้งครรภ์ ที่มาฝากท้องในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือ เริ่มมีความเข้าใจเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย ดังนี้

1 โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคที่รักษาไม่หาย ต้องรักษาตลอดชีวิต และมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

2 พ่อ และแม่ ที่ดูเป็นปกติ (เป็นพาหะ)สามารถมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย ได้

3. แต่พ่อ และแม่ ที่ดูเป็นปกติ (เป็นพาหะ)มีโอกาสคัดเลือกเฉพาะลูก ที่ไม่เป็นโรคได้ ทำให้ลดจำนวนการเกิดใหม่ของผู้ป่วยโรค

**งบประมาณ รวมทั้งสิ้น** 248,000 บาท

งบประมาณที่ขอปีที่ 1 รวม 120,000 บาท

งบประมาณที่ขอปีที่ 2 รวม 128,000 บาท

*Reference*


1.Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairom V, Siriboon W(1991) Review :Prenatal Diagnosis thalassemia and Hemoglobinopaties in Thailand. Asean J. Trop. Med Public Health 22(1) : 16-29.

2. Livingston FB(1985) Frequencies of hemoglobin variants, thalassemia, the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency ,G6PD variants and ovalocytosis in human population. Oxford University Press, Oxford.

3.Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravatmuang P, Winichagoon P, Fucharoen S (1980) Thalassemia in Thailand . Ann NY Acad Aci 344:352-363.

4.Na-Nakorn S, Minnich V, Chernoff AI, Quaggui-Puag S, and Chavalekviraj K: Studies on haemoglobin E. II: The incidence of haemoglobin E in Thailand. J Lab Clin Med 1956; 47: 490-498.

5.Na-Nakorn S and Wasi P: The distribution of hemoglobin E: hemoglobin E triangle in Southeast Asia. Med Assoc Thai 1978; 61: 65.

6.Pravatmuang P, Tiloklurs M, Suannum M, and Chaipat C: Phitsanulok population: The highest incidence of hemoglobin E in the northern province of Thailand and PND counseling. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995; 26 Suppl 1: 266-270.

7.Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed, Oxford: Blackwell Science, 2001

8.Na-Nakorn S, Minnich V, Chernoff AI, Quaggui-Puag S, and Chavalekviraj K: Studies on

haemoglobin E. II: The incidence of haemoglobin E in Thailand. J Lab Clin Med 1956; 47: 490-498.

9 Na-Nakorn S and Wasi P: The distribution of hemoglobin E: hemoglobin E triangle in Southeast Asia. Med Assoc Thai 1978; 61: 65.

10.Wasi P: Haemoglobinopathies including thalassemia. I Tropical Asia. Clin Hematol 1981; 10: 707-729.

11. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, ธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง การรักษา การควบคุมและป้องกัน; กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับภาควิชากุมารเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2543

12 ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, ภัทรา ธนรัตนากร, ไฮริส เอฟ เสตเกอร์, สุรสิทธิ์ ชมชื่น, ธีระ ทองสงค์, พฤหัส จันทร์ประภาส, พรรณี สิริวรรณธนาภา, และสุพัตรา ศิริโชติยกุล, การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค Homozygous $\beta$-thalassemia โดยการวิเคราะห์ชนิดของ Fetal Hb ด้วย Automated HPLC, วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543; 10: 91-101.