การตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนในน้ำคร่ำเพื่อการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดของโรคทางพันธุกรรม

An approach for detecting contamination in amniotic fluid for genetic prenatal diagnosis.

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ดาวัลย์ ฉิมภู่

คุณวุฒิ : Ph.D.(Biochemistry)

ตำแหน่ง : รองศาสตราจารย์ระดับ 9 สังกัดภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ นพ. ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี

ตำแหน่ง : ศาสตราจารย์เกียรติคุณ สังกัดคณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี

ตำแหน่ง : อธิการบดี มหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะผู้ร่วมวิจัย

ร้อยโทหญิงสายศิริ มีระเสน

คุณวุฒิ : วท.ม. (ชีวเคมี)

ตำแหน่ง : พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์) สังกัดภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
อ. เมือง จ. พิษณุโลก

นายสัตวแพทย์พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

คุณวุฒิ : สพ.บ.

ตำแหน่ง : อาจารย์ ระดับ 4 สังกัดภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

นายแพทย์พีระพล วอง

คุณวุฒิ : พบ., วว. อายุรศาสตร์ทั่วไป, วว. อายุรศาสตร์โลหิตวิทยา, วทม.

ตำแหน่ง : อาจารย์ระดับ 7 สังกัดคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

แพทย์หญิงสุชิลา ศรีทิพยวรรณ

คุณวุฒิ : พบ., วว. อายุรศาสตร์ทั่วไป,

ตำแหน่ง : อาจารย์ระดับ 5 สังกัดคณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก

หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย

หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

หน่วยงานอื่นที่ร่วมโครงการ

- หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
- หน่วยบริจาคโลหิต โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก 65000

ได้รับความอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2548

จำนวนเงินรวม 280,000 บาท

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย : สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

ประเภทของงานวิจัย : การวิจัยและพัฒนา

เริ่มทำการวิจัย เมื่อ

1 ตุลาคม 2547 ถึง 30 กันยายน 2548

คำสำคัญของแผนงานวิจัย

โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia)

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (Prenatal diagnosis)

การตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอนเอของมารดาในน้ำคร่ำ (Maternal cell contamination)

มินิแซทเทลไลท์ (Minisatellite)

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite)

1. ความสำคัญและที่มาของแผนงานวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมที่มีอุบัติการณ์สูงและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี จากรายงานทางสถิติ ปี 2544 พบว่า หญิงมีครรภ์ 8,877 คนที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก จะมีทารกเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิด homozygous α-thalassemia 1 จำนวน 11 คน, ชนิด compound heterozygous β- thalassemia/HbE 17 คนต่อปี และชนิด homozygous β-thalassemia 1 คนต่อปี[1] ชนิดแรกยังไม่มีวิธีการรักษา ทารกจะเสียชีวิตในครรภ์หรือหลังคลอดไม่นานและก่อให้เกิดปัญหาในการดูแลรักษามารดาในแง่ของภาวะแทรกซ้อน ส่วนสองชนิดหลังจะใช้การรักษาแบบประคับประคอง เช่นการให้เลือดทดแทน รวมทั้งยาขับเหล็กเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี ซึ่งเป็นปัญหาต่อครอบครัวและประเทศชาติทั้งในแง่เศรษฐกิจและสังคม แต่ละปีรัฐต้องใช้งบประมาณในการดูแลผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก จึงถือเป็นนโยบายระดับชาติที่จะต้องป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมีย แนวทางในการแก้ปัญหาโรคธาลัสซีเมียคือ การป้องกันไม่ให้มีทารกเกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียโดยการตรวจคัดกรองหาพาหะในคู่สามีภรรยาเพื่อหาคู่เสี่ยง การให้

คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (counseling) การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) ตลอดจนเลือกยุติการตั้งครรภ์ในรายที่ทารกในครรภ์เป็นโรคตามความสมัครใจของคู่สามีภรรยา[2]

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดที่จังหวัดพิษณุโลก สูติแพทย์จากโรงพยาบาลพุทธชินราช จะทำการเจาะดูดน้ำคร่ำในช่วงกลางไตรมาศที่สองของการตั้งครรภ์ (16-18 สัปดาห์) เพื่อนำเซลล์ทารกในครรรภ์มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อดำเนินการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากการตรวจวินิจฉัยที่ผ่านมาพบว่าถ้ามีเลือดของมารดาปะปนอยู่ในน้ำคร่ำ โอกาสการปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในดีเอ็นเอของทารกในครรภ์ค่อนข้างสูงทำให้ผลการตรวจวินิจฉัยผิดพลาดได้จึงจำเป็นต้องมีการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนของดีเอ็นเอมารดา โดยเฉพาะในรายที่ตรวจพบว่าทารกในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียเพื่อป้องกันการตรวจวินิจฉัยผิดพลาด[3-4]

การตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนของดีเอ็นเอมารดาในน้ำคร่ำอาศัยหลักการเดียวกับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดหรือการพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก โดยตรวจสอบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ พบว่าดีเอนเอของมนุษย์ทุกคนจะแตกต่างกัน เนื่องจากพ่อและแม่จะถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่ลูกในลักษณะจากพ่อครึ่งหนึ่งจากแม่ครึ่งหนึ่งกลายเป็นดีเอ็นเอชุดใหม่ของลูกที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวซึ่งสามารถนำมาตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนได้ โดยการตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอลักษณะแบบซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ได้แก่ VNTR และ STR ซึ่งมีจำนวนชุดซ้ำที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล ถ้าตรวจน้ำคร่ำแล้วพบอัลลีลของแม่ทั้ง 2 อัลลีล และอัลลีลของลูกที่มาจากพ่ออีก 1 อัลลีลแสดงว่ามีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของแม่ในสิ่งส่งตรวจ จำเป็นต้องทำการเจาะดูดน้ำคร่ำใหม่เพื่อผลการตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง

โลกัสที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำจะต้องมีค่ากำลังการแยกแยะและการกระจายตัวสูงในประชากรพิษณุโลกเพื่อความสะดวกและแม่นยำในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด โดยจะทำการตรวจเพียงหนึ่งโลกัส แต่ถ้าไม่สามารถตรวจพิสูจน์ได้ในตัวอย่างตรวจนั้นจึงจะใช้โลกัสที่สองต่อไป จึงจำเป็นต้องศึกษาหาโลกัสที่เหมาะสมอย่างน้อย 5 ตำแหน่งเพื่อใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ[3]

เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มย่อยแต่ละพื้นที่ (geographic distribution) ทำให้ความหลากหลายของโลกัสที่ได้จากประชากรแต่ละกลุ่ม ไม่เหมือนกัน หากเลือกใช้โลกัสที่มีการกระจายตัวไม่ดี ต้องเสียเวลาในการเลือกโลกัสตำแหน่งอื่นต่อไป ทำให้เกิดความล่าช้าในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด[4-5] จากการศึกษาข้อมูลของมินิแซทเทิลไลท์ (VNTR) พบว่าโลกัส D1S80 มีกำลังการแยกแยะสูงในชาวเอเชีย โดยชาวเชียงใหม่มีค่ากำลังการแยกแยะเท่ากับ 0.94[9] ซึ่งใกล้เคียงกับชาวกะเหรี่ยงในภาคเหนือของไทยเท่ากับ 0.95[10] ส่วนชาวจีนมีค่ากำลังการแยกแยะ 0.90-0.97[11-13] ใกล้เคียงกับชาวญี่ปุ่น 0.91-0.98[14-15] และชาวมาเลเซีย 0.96[16] แต่ในชาวฟิลิปปินส์มีค่ากำลังการแยกแยะเท่ากับ 0.82[17] ส่วนโลกัส ApoB นั้นมีค่าการกระจายตัวในชาวจีน มาเลเซีย และอินเดียที่อาศัยอยู่ในประเทศสิงคโปร์เท่ากับ 0.5980, 0.5260 และ 0.6749 ตามลำดับ[18] ส่วนค่าการกระจายตัวในชาวอินเดียตะวันออกเฉียงเหนือ ชาวเกาะปัวนิวกินี ชาวอินเดียในแคนาดา ชาวอินเดียในชิลี และชาวเยอรมันเท่ากับ 0.55-0.78[19] ชาวฝรั่งเศสมีค่าการกระจายตัวใกล้เคียงกับชาวอเมริกาคือ 0.769[20] และ 0.75[21] ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาข้อมูลของไมโครแซทเทิลไลท์ (STR) ในกรุงเทพมหานครพบว่าโลกัสที่มีกำลังการแยกแยะเรียงจากมากไปน้อยคือ FGA, D18S51, D8S1179, D21S11, vWA, D13S317, D5S818,

D7S820, D3S1357, THO1, CSF1PO และ TPOX เท่ากับ 0.9688, 0.9615, 0.9606, 0.9487, 0.9231, 0.9229, 0.9175, 0.9120, 0.8879, 0.8796, 0.8783 และ 0.8082 ตามลำดับ[22-23] และที่จังหวัดเชียงใหม่มีการศึกษากำลังการแยกแยะและการกระจายตัวของโลกัส vWA มีค่าเท่ากับ 0.93210 และ 0.81[24] ใกล้เคียงกับชาวกระเหรี่ยงในภาคเหนือ 0.85 [10] และมีค่าใกล้เคียงกับชาวเวียตนาม กัมพูชา และจีนตอนใต้[25] ส่วนค่ากำลังการแยกแยะของโลกัส THO1 ในจังหวัดเชียงใหม่เท่ากับ 0.8722 [26] ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับชาวเอเชียที่อาศัยอยู่ในอเมริกา[27] และออสเตรเลีย[28] แต่ต่างจากชาวญี่ปุ่น[29] พบว่าโลกัสนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ ในคนไทย จึงมีการศึกษาโลกัส DYS385 ในจังหวัดเชียงใหม่มีค่ากำลังการแยกแยะเท่ากับ 0.9430 ซึ่งใกล้เคียงกับชาวกรุงเทพมหานคร[30] นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบโลกัส D12S391 ในชาวจีน ไทย ญี่ปุ่น และเยอรมันมีค่ากำลังการแยกแยะเท่ากับ 0.95, 0.96, 0.95 และ 0.97 ตามลำดับ[31]

ข้อมูลไมโครแซทเทิลไลท์ (STR) ในบริเวณประเทศข้างเคียงพบว่าประเทศเวียตนามมีการศึกษาความถี่ของอัลลีล STR จำนวน 16 โลกัสซึ่งมีค่ากำลังการแยกแยะเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ ACTBP2, Penta E, FGA, D8S1179, D18S51, Penta D, D21S11, D13S317, D5S818, D16S539, VWA, D7S820, THO1, CSF1PO, D3S1358 และ TPOX เท่ากับ 0.987, 0.973, 0.966, 0.960, 0.951, 0.941, 0.938, 0.923, 0.919, 0.918, 0.914, 0.908, 0.891, 0.851, 0.846 และ 0.787 ตามลำดับ[32] ข้อมูล STR จำนวน 9 โลกัสของชาวธิเบตพบว่ากำลังการแยกแยะเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ D13S317, D16S519, D7S820, vWA, THO1, TPOX , CSF1PO, F13A01 และ FESFPS มีค่าเท่ากับ 0.957, 0.955, 0.950, 0.947, 0.944, 0.944, 0.933, 0.909 และ 0.909 ตามลำดับ[33]

ในฮ่องกงมีรายงานข้อมูล STR จำนวน 12 โลกัสเรียงจากกำลังการแยกแยะจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ FGA, D18S51, D8S1179, D21S11, vWA, D5S818, D13S317, D7S820, CSF1PO, D3S1358, THO1 และ TPOX เท่ากับ 0.968, 0.965, 0.961, 0.949, 0.934, 0.926, 0.917, 0.908, 0.885, 0.873, 0.854 และ 0.768[34] และมีรายงานข้อมูลประชากรจีนจำนวน 3 โลกัสเรียงค่าการกระจายตัวจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ CSF1PO, HUMTHO1 และ TPOX เท่ากับ 12, 11 และ 7 [35] ที่เกาหลีพบการกระจายตัวของ 9 โลกัสเรียงจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ FGA, D18S51, D8S1179, D13S317, D21S11, vWA, D5S818, D7S820 และ D3S1358 เท่ากับ 0.996, 0.959, 0.954, 0.932, 0.929, 0.924, 0.920, 0.916 และ 0.876[36]

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าในแต่ละพื้นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มย่อย คณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาข้อมูล VNTR และ STR ที่โลกัสต่างๆ ของประชากรในจังหวัดพิษณุโลก จึงศึกษาความถี่ (allele frequency), การกระจายตัว (heterozygosity), กำลังการแยกแยะ (power of discrimination) และ กำลังการคัดออก (power of exclusion) ของ VNTR โดยเริ่มที่โลกัส D1S80[6-8] เนื่องจากมีการกระจายตัวและกำลังการแยกแยะสูงและโลกัส ApoB[3] เนื่องจากสามารถตรวจด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนได้เร็ว จากนั้นจึงศึกษาข้อมูลของไมโครแซทเทิลไลท์ 4 โลกัสคือ D5S818, D8S1179, D13S317 และ vWA ในประชากรจังหวัดพิษณุโลก เทียบกับข้อมูลในจังหวัดกรุงเทพมหานคร และจังหวัดเชียงใหม่เพื่อคัดเลือกโลกัสที่เหมาะสมเป็นอันดับต่อไป เพื่อใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจ และเป็นประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและแยกความแตกต่างระหว่างบุคคลในจังหวัดพิษณุโลก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวเพื่อการศึกษาวิวัฒนาการความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรจังหวัดพิษณุโลก

2. **วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย**

เพื่อศึกษาหามินิและไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนในน้ำคร่ำสำหรับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดในโรคทางพันธุกรรมในจังหวัดพิษณุโลก เช่น โรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง เป็นต้น

3. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์**

3.1 ทราบข้อมูลการกระจายตัว ความถี่และกำลังการแยกแยะของ VNTR และ STR โลกัสต่างๆ ในประชากรพิษณุโลก

3.2 ได้โลกัสที่เหมาะสมมาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ ทำให้การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดของโรคทางพันธุกรรมมีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

3.3 ได้วิธีการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนในน้ำคร่ำสำหรับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโรคทางพันธุกรรมในจังหวัดพิษณุโลก เช่นโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง

4. **ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย**

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรพิษณุโลกว่ามีความแตกต่างไปจากข้อมูลของประชากรที่พื้นที่อื่นหรือไม่ เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มย่อยแต่ละพื้นที่ ทำให้ความหลากหลายของโลกัสที่ได้จากประชากรแต่ละกลุ่มไม่เหมือนกัน (geographic distribution) และเป็นไปตามกฎของ Hardy- Weinberg หรือไม่ จากนั้นจึงคัดเลือก VNTR หรือ STR โลกัสที่มีการกระจายตัวและกำลังการแยกแยะสูงมาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ เพื่อการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น โดยจะทำอย่างน้อย 3 โลกัส

5. **ระเบียบวิธีวิจัย**

เป็นการวิจัยแบบพรรณนาไปข้างหน้า (prospective descriptive study) เพื่อตอบคำถามการวิจัยที่มุ่งเน้นศึกษาหาโลกัสที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ โดยหาค่าการกระจายตัว กำลังการแยกแยะของ VNTR และ STR และความถี่ของแต่ละอัลลีล จำนวน 6 โลกัส แยกเป็น VNTR จำนวน 2 โลกัส ได้แก่ D1S80 และ ApoB ส่วน STR จำนวน 4 โลกัส ได้แก่ D5S818, D8S1179, D13S317 และ vWA ซึ่งมีค่ากำลังการแยกแยะไม่ต่ำกว่า 0.9000 (0.9175, 0.9606, 0.9229 และ 0.9231 ตามลำดับ[22]) แต่ถ้าโลกัสที่เลือกมาศึกษาให้ค่ากำลังการแยกแยะ การกระจายตัว และความถี่ไม่สูงพอในประชากรพิษณุโลก จะทำการศึกษาต่อในอีก 2 โลกัส คือ D16S539 และ THO1[26] เพื่อให้ได้โลกัสที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนเป็นอันดับต่อไป

6. **ขอบเขตของโครงการวิจัย**

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือประชากรจังหวัดพิษณุโลกที่มาบริจาคโลหิต ที่หน่วยบริการโลหิต โรงพยาบาลพุทธชินราช จำนวน 500 ราย โดยผู้บริจาคต้องเป็นคนจังหวัดพิษณุโลกโดยกำเนิดและไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด เมื่อสมัครใจและยินยอมให้เก็บตัวอย่างเลือด จึงแบ่งเลือดมาประมาณ 3 มิลลิลิตรใส่หลอดปลอดเชื้อที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex method[33]

แล้วหาความถี่ของอัลลีล การกระจายตัวและกำลังการแยกแยะในแต่ละโลกัสโดยเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

เมื่อได้โลกัสที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ โดยประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ หญิงมีครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จำนวน 10 ราย เมื่อหญิงมีครรภ์และสามีซึ่งเป็นชาวพิษณุโลกสมัครใจและยินยอมเข้าร่วมวิจัย จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดของทั้งคู่ และแบ่งตัวอย่างน้ำคร่ำประมาณ 5 มิลลิลิตร มาตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำโดยใช้โลกัสตำแหน่งดังกล่าว และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ ก่อนดำเนินการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโรคทางพันธุกรรม เช่น โรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงต่อไป

7. **ระยะเวลาที่ทำการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง และหรือเก็บข้อมูลของโครงการวิจัย**

1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2547-กันยายน 2549

7.1 **สถานที่ในการทำวิจัย**

หน่วยปฏิบัติการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

8. **แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย**

เมื่อคัดเลือกได้โลกัสที่เหมาะสมในการนำมาตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำแล้ว จะนำเสนอให้มีการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำก่อนดำเนินการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโรคทางพันธุกรรมทุกครั้ง เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด รวมทั้งเผยแพร่วิธีการไปยังโรงพยาบาลประจำจังหวัดอื่นๆ บริเวณภาคเหนือตอนล่าง และทำการศึกษาหาข้อมูลการกระจายตัวในแต่ละโลกัสเพิ่มเติมในประชากรบริเวณภาคเหนือตอนล่าง เพื่อให้ได้โลกัสที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ เพื่อให้ผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดมีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

9. **ตัวชี้วัด**

9.1 **ตัวชี้วัดเชิงปริมาณ**

จำนวน 80% ของประชากรในเขตพื้นที่ที่ทำการศึกษามีความเข้าใจถึงอันตรายจากโรคธาลัสซีเมียและรู้วิธีการป้องกันไม่ให้ตนเองมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียสอดคล้องกับการดำเนินงานทางด้านสาธารณสุขแนวใหม่

9.2 **ตัวชี้วัดเชิงคุณภาพ**

-ลดอุบัติการณ์จากโรคธาลัสซีเมีย
-ประชากรโดยรอบเขตพื้นที่ทำการศึกษามีสุขภาพแข็งแรงส่งผลให้สามารถประกอบอาชีพอย่างมีประสิทธิภาพ ที่สำคัญทำให้ค่าใช้จ่ายในการดูแลสุขภาพตนเองของชุมชนลดลง
-ช่วยรัฐประหยัดงบประมาณในการรักษาโรคธาลัสซีเมียของชุมชน

9.3 **ตัวชี้วัดเวลา**

ภายในเวลา 1 ปี (1 ตุลาคม 2547- 30 กันยายน 2548)

ประชากรในเขตพื้นที่ทำการศึกษา ร้อยละ 80 มีความเข้าใจถึงอันตรายจากโรคธาลัสซีเมียและรู้วิธีการ ป้องกันไม่ให้ตนเองมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย

9. **ผลการวิจัย**

จากการศึกษาหาการกระจายตัวและกำลังการแยกแยะในแต่ละโลกัสโดยเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) จำนวน 5 โลกัส ได้แก่ D1S80, D5S818, D8S1179, D13S317 และ vWA พบว่า ค่าการกระจายตัวในประชากรในจังหวัดพิษณุโลกคือ 0.84276, 0.782588, 0.85826, 0.78428 และ 0.805634 ตามลำดับ ค่ากำลังการแยกแยะของแต่ละโลกัส คือ 0.95628, 0.91632, 0.961592, 0.92076 และ 0.93052 ตามลำดับ ค่ากำลังการคัดออกของแต่ละโลกัสคือ 0.68945, 0.57516, 0.79543, 0.58335 และ 0.73451 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับในจังหวัดเชียงใหม่และกรุงเทพมหานคร[22-24] ความถี่อัลลีลของแต่ละโลกัส (ตารางที่ 2) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับจังหวัดเชียงใหม่และกรุงเทพมหานคร[9,22-24]

ตารางที่ 1 แสดงค่าการกระจายตัว(Heterozygosity) กำลังการแยกแยะ (PD) และกำลังการคัดออก (PE) ของแต่ละโลกัส ในประชากรจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 500 คน

	D1S80	D5S818	D8S1179	D13S317	vWA
Exp. Heterozygosity	0.8436	0.78337	0.859119	0.78506	0.80702
Obs. Heterozygosity	0.84276	0.78258	0.85826	0.78428	0.80563
PD	0.95628	0.91632	0.96159	0.92076	0.93052
PE	0.68945	0.57516	0.79543	0.58335	0.73451
PE (one)	0.69241	0.57516	0.711282	0.58088	0.61475

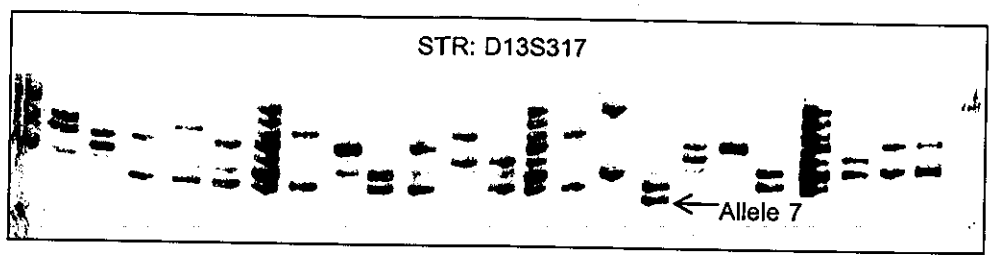
สำนักหอสมุด
25 พ.ย. 2548
4910066
จ BG 103 ค4ร1ก 2548

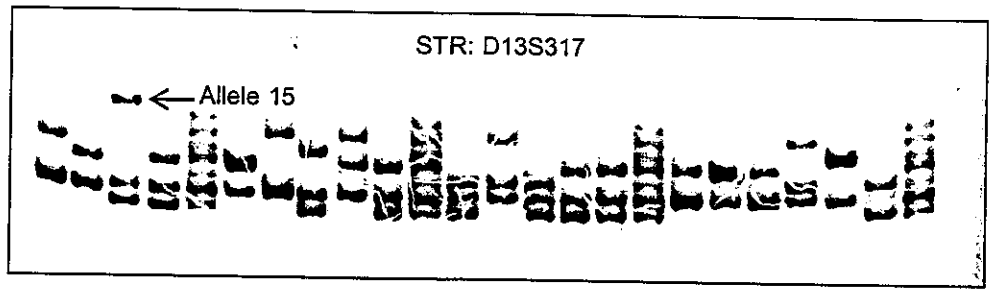
ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในประชากรจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 500 คน

Allele	D1S80	D5S818	D8S1179	D13S317	vWA
7		0.025		0.005	
8		0.001	0.002	0.324	
9		0.053	0.003	0.127	
10		0.257	0.145	0.124	
11		0.276	0.132	0.224	
12		0.236	0.127	0.136	
13		0.124	0.18	0.034	0.001
14		0.026	0.141	0.005	0.255
15		0.002	0.162	0.005	0.024
16	0.008		0.092		0.146
17			0.012		0.241
18	0.207		0.004		0.193
19	0.004				0.105
20	0.003				0.033
21	0.007				0.002
22	0.017				
23	0.011				
24	0.254				
25	0.023				
26					
27	0.047				
28	0.12				
29	0.02				
30	0.089				
31	0.153				
32	0.019				
33					
34					
35					
36	0.003				
37	0.004				
38					
39					
40					
41	0.003				
>41	0.008				

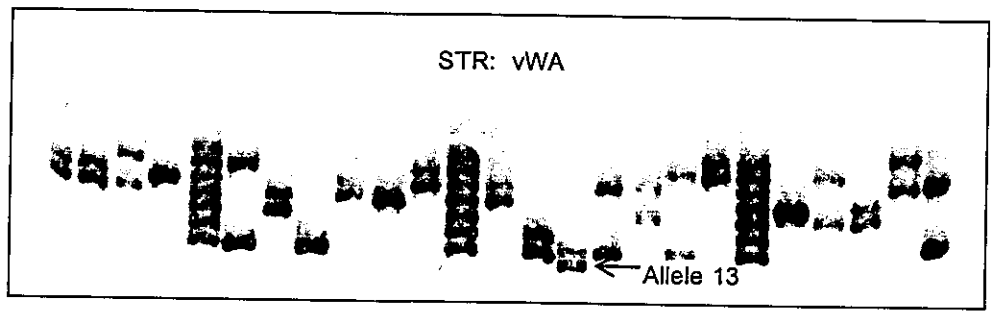
นอกจากนี้ยังพบอัลลีลที่ 7(0.005) และ 15(0.005) ของโลกัสที่ D13S317 (รูปที่ 1) รวมทั้งอัลลีลที่ 13(0.001) และ อัลลีลที่ 21(0.002) ของโลกัส vWA (รูปที่ 2) ซึ่งไม่มีรายงานในจังหวัดกรุงเทพมหานคร[22-23] แสดงถึงความเหมาะสมของการนำโลกัสเหล่านี้มาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำในประชากรจังหวัดพิษณุโลก

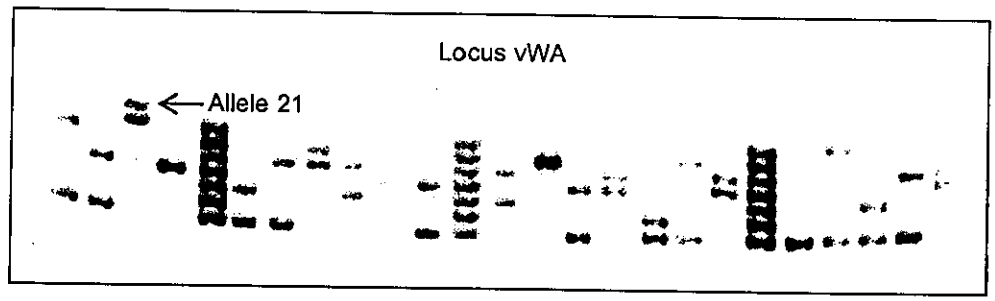
รูปที่ 1 อัลลีลที่ 7 และ 13 ของโลกัส D13S317 ที่ไม่พบในประชากรจังหวัดกรุงเทพมหานคร





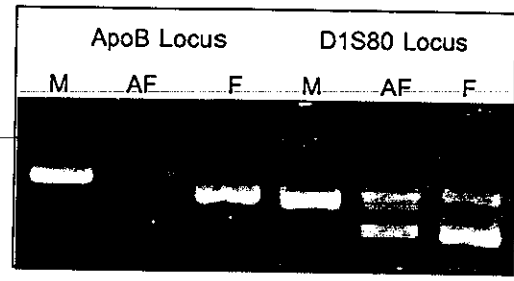
รูปที่ 2 อัลลีลที่ 13 และ 21 ในโลกัส vWA ที่ไม่พบในประชากรจังหวัดกรุงเทพมหานคร



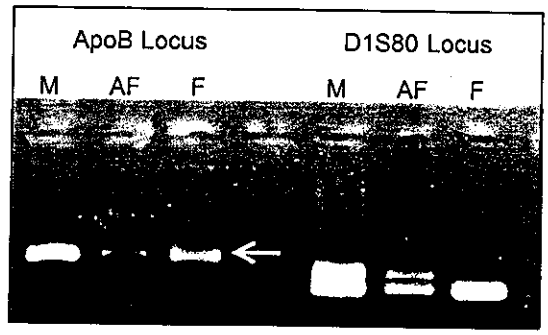


ต่อมาได้ศึกษาการนำโลกัสต่าง ๆ มาใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำในหญิงมีครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จำนวน 10 ราย พบว่าการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำโดยใช้โลกัส D1S80 และ ApoB สามารตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนได้ 9 ราย (รูปที่ 3) อีก 1 รายต้องใช้โลกัสอื่นตรวจพิสูจน์เนื่องจากในหญิงตั้งครรภ์และสามีมีอัลลีลเดียวกันและเป็น homozygote ของโลกัสทั้งสอง (รูปที่ 4) โดยโลกัสอื่นที่ใช้คือ D13S317, D5S818, D8S1179 และ vWA (รูปที่ 5)

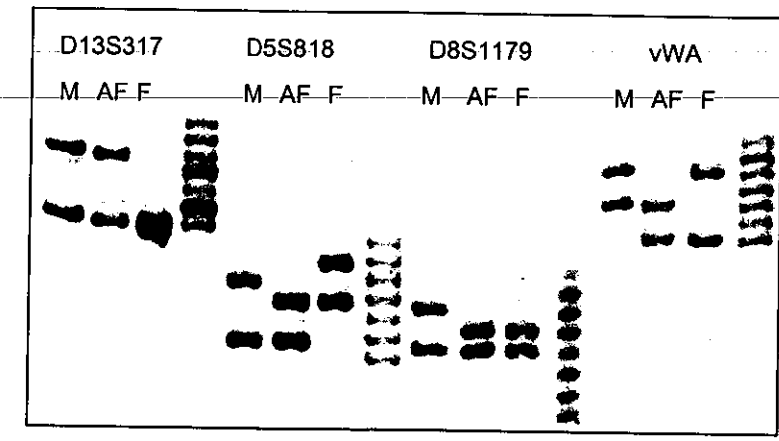
รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำในหญิงมีครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยใช้ VNTR 2 โลกัสคือ ApoB และ D1S80 แสดงถึงไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ (M=Mother, AF=Amniotic fluid, F=Father)



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำในหญิงมีครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยใช้ VNTR โลกัส ApoB (M=Mother, AF=Amniotic fluid, F=Father) ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ เนื่องจากในหญิงตั้งครรภ์และสามีมีอัลลีลเดียวกันและเป็น homozygote (ลูกศรชี้) ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่ามีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำหรือไม่ จึงใช้โลกัส D1S80 มาตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนแทน



รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำในหญิงมีครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยใช้ STR 4 โลกัสคือ D13S317, D5S818, D8S1179 และ vWA แสดงถึงไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ สามารถนำน้ำคร่ำรายนี้ไปดำเนินการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดต่อไป (M=Mother, AF=Amniotic fluid, F=Father)



10. **สรุป**

จากการศึกษาความถี่ (allele frequency), การกระจายตัว (heterozygosity), กำลังการแยกแยะ (power of discrimination) และ กำลังการคัดออก (power of exclusion) ของ VNTR และ STR พบว่าในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำในหญิงมีครรภ์ที่มารับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด สามารถนำ VNTR โลกัส D1S80 และ ApoB มาใช้ตรวจพิสูจน์เนื่องจากมีการกระจายตัวและกำลังการแยกแยะสูง และสามารถตรวจด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนได้เร็ว ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจพิสูจน์ด้วย VNTR 2 ตำแหน่งดังกล่าวจึงทำการตรวจพิสูจน์ใน STR 4 ตำแหน่งคือ D13S317, D5S818, D8S1179 และ vWA ต่อไป

นอกจากนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจแล้ว ข้อมูลนี้ยังเป็นประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด และแยกความแตกต่างระหว่างบุคคลในประชากรจังหวัดพิษณุโลก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวเพื่อการศึกษาวิวัฒนาการความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรจังหวัดพิษณุโลก

11. **เอกสารอ้างอิงของแผนงานวิจัย**

1. พิริยา ถนอมรัตน์, พีระพล วอง, ความชุกของธาลัสซีเมียเทรตจากการตรวจคัดกรองในหญิงตั้งครรภ์ของจังหวัดพิษณุโลก, บทคัดย่อ: การประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ เรื่อง พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน ครั้งที่ 13, 3-5 มิถุนายน 2546, มหาวิทยาลัยนเรศวร, หน้า 87-90.
2. วิชัย เทียนถาวร, จินตนา พัฒนาพงศ์ธร. รายงานการประชุม โครงการป้องกันและควบคุมโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย กองโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค, สิงหาคม 2544, หน้า 1-2.

3. Antoniadi T, Yapijakis C, Kaminopetros P, Makatsoris C, Velissariou V, Vassilopoulos D, Petersen MB. A simple and effective approach for detecting maternal cell contamination in molecular prenatal diagnosis. Prenat Diang 2002;22:425-29.
4. Smith GW, Graham CA, Nevin J, Nevin NC. Detection of maternal cell contamination in amniotic fluid cell cultures using fluorescent labelled microsatellites. J Med Genet 1995;32:61-64.
5. Batanian JR, Ledbetter DH, Fenwick RG. A simple VNTR-PCR method for detecting maternal cell contamination in prenatal diagnosis. Genet Test 1998;2:347-50.
6. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR D1S80 by the PCR follwed by high-resolution PAGE. Am J Hum Genet 1991;48:137-44.
7. Suwanpoochai S, Thonglairoam V, Winichagoon P, Fucharoen S. VNTR patterns of D1S80 locus in the Thai families: potential use for the detction of maternal cell contamination in prenatal diagnosis. Abstract: Third Annual Conference on the Prevention and Control of Thalasseia. November 9-10, 1995, Chaingmai University, Chiangmai, page7.
8. จำนงค์ นพรัตน์, วรรณรัตน์ แซ่ชั่น, ศตรณ กาญจนโอภาส, ผลการตรวจการปนเปื้อนดีเอ็นเอของแม่ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โดยวิธีพีซีอาร์ของ VNTR Locus D1S80, บทคัดย่อ : การสัมมนาวิชาการเรื่องการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ครั้งที่ 4, 21-22 พฤศจิกายน 2539, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, หน้า 13.
9. Bhoopat T, Steger HF.Frequency distribution of D1S80 alleles in northern Thai population analyzed by amplified fragment length polymorphism technique. Forensic Sci Int 1996;81:149-55.
10. Steger HF, Bhoopat T, Sridoungkaew S, Sanguansermri T. The distribution of D1S80 and VWA alleles in a Karen population from Northen Thailand. J Forensic Sci 2000;45:440-41.
11. Cong B, Harashima N, Katsuyama Y, Tsuchikane A, FukushimaH. Chinese Han population study of the D1S80 (pMCT118) locus polymorphisms. Nippon Hoigaku Zasshi 1996;50:23-26.
12. Huang NE, Chakraborty R, Budowle B. D1S80 allele frequencies in a Chinese population. Int J Legal Med 1994;107:118-20.
13. Tie J, Oshida S, Chiba S, Tsukamoto S, Sebetan IM. Frequency of D1S80 and HLA DQ alpha alleles in a Chinese population. Int J Legal Med 1995;108:170-71.
14. Nagai A, Yamada S, Bunai Y, Ohya I. Analysis of the VNTR locus D1S80 in a Japanese population. Int J Legal Med 1994;106:268-70.
15. Sugiyama E, Honda K, Katsuyama Y, Uchiyama S, Tsuchikane A, Ota M, Fukushima H. Allele frequency distribution of the D1S80 (pMCT118) locus polymorphism in the Japanese population by the polymerase chain reaction. Int J Legal Med 1993;106:111-14.

16. Koh CL, Lim ME, Ng HS, Sam CK. D1S80 (pMCT118) allele frequencies in a Malay population sample from Malaysia. Int J Legal Med 1997;110:39-40.
17. Halos SC, Fortuno ES 3rd, Ferreon AC, Chu JY, Miranda J, Harada S, Benecke M. Allele frequency distributions of the polymorphic STR loci HUMVWA, HUMFES, HUMF13A01 and the VNTR D1S80 in a Filipinno population from Metro Manila. Int J Legal Med 1998;111:224-26.
18. Choong ML, Koay ES, Khaw MC, Aw TC. Apolioprotein B 5'-Ins/Del and 3'-VNTR polymorphisms in Chinese, Malay and Indian Singaporeans. Hum Hered 1999;49:31-40.
19. Deka R, Charaborty R, DeCroo S, rothhammer F, Barton SA, Ferrell RE. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipopritein B gene in five human population. Am J Hum Genet 1992;51:1325-33.
20. Chakraborty R, Fornage M, Gueguen R, Boerwinkle E. Population genetics of hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population. EXS 1991;58:127-43.
21. Boerwinkle E, Xiong WJ, Fourest E, Chan L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:212-16.
22. Rerkamnuaychoke B, Chantratita W, Jomsawat U, Thanakitgosate J, Ruangvithayanon T, Rojanasunan P. Database of nine tetrameric STR loci-D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 and D7S820 in Thai population. Foensic Sci Int 2001;119:123-25.
23. Chantratita W, Rerkamnueychoke B, Jomsawat U, Thanakitgosate J, Ruangvithayanon T, Rojanasunan P. Thai population data on nine tetrameric STR loci-D3S1358, vWA, FGA, THO1, TPOX, CSF1PO, D5S828, D13S317 and D7S820. Forensic Sci.Int 2001;115:113-15.
24. Horst B, Eigel A, SanguansermsriT, Rolf B, Analysis of the short tandem repeat systems HumVWA and HumF13B in a population sample from northern Thailand, Int J Legal Med 1997;110:235-37.
25. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. The histry and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton NJ, 1994.
26. Bhoopat T, Sriduangkaew S, Steger HF. An investigation of the THO1 locus in a population from northern Thailand. Int J Legal Med 1997;110:286-87.
27. T Sueblinvong, U Kongsrisook Population data of 8 short tandem repeat loci in the Thai population Foren Sci Inter 1999;103:199-205.
28. Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTHO1 (AATG)n and