

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์ Chromosome Breakage ที่ชักนำด้วย

สาร Diepoxybutane (DEB) เพื่อวินิจฉัย Fanconi Anemia ในคนไทย

สมพร เทียงทัศน์, วิษณุ คุ้มมกล, ยอดสวาสดี เทพรานนท์* และ พิมพิชญา ปัทมสิริวัฒน์

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์, *ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ: การวิจัยนี้ได้ศึกษาการแตกหักของโครโมโซม (chromosome breakage) ที่ชักนำโดยสาร clastogen ในคนไทยปกติ 30 คน และครอบครัวผู้ป่วย Fanconi anemia (FA) 7 ครอบครัว โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ และใช้สาร Diepoxybutane (DEB) ชักนำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ซึ่งสาร DEB ใช้ทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 ไมโครกรัม/มล. (ไม่ใส่ DEB), 0.01, 0.1, 0.2 ไมโครกรัม/มล. สำหรับคนปกติ ส่วนผู้ป่วย FA ใช้สาร DEB ในความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 ไมโครกรัม/มล. การเตรียมโครโมโซมทำโดยดัดแปลงวิธีมาตรฐาน การวิเคราะห์ chromosome breakage ใช้ทั้งกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย x 100) และเครื่องวิเคราะห์โครโมโซมอัตโนมัติ รุ่น cytovision ซึ่งทำการวิเคราะห์โครโมโซมทั้งหมด 20 เมตาเฟสต่อหนึ่งความเข้มข้นของ DEB ต่อหนึ่งตัวอย่าง รวมจำนวน เมตาเฟสที่ทำการวิเคราะห์ 2400 เมตาเฟส ในกลุ่มคนปกติ และ 1260 เมตาเฟสในกลุ่มครอบครัว FA รวมวิเคราะห์ทั้งหมด 3660 เมตาเฟส

ผลการวิเคราะห์โครโมโซมในคนปกติ ไม่พบ chromosome breakage ในทุกๆ ความเข้มข้นของ DEB และในทุกตัวอย่างทดสอบ ส่วนผู้ป่วย FA 7 ครอบครัว พบ chromosome breakage 5 ครอบครัว ไม่พบ chromosome break 2 ครอบครัว ผู้ป่วย FA ที่พบส่วนใหญ่มี chromosome breakage เกิดขึ้นได้ง่ายใน DEB ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/มล. และในความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/มล. หรือไม่มี DEB (spontaneous break) ในผู้ป่วยบางราย ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้สาร DEB ในความเข้มข้นมากถึง 0.2 ไมโครกรัม/มล. ไม่สามารถทำให้โครโมโซมของคนปกติเกิดมี breakage ให้เห็นได้ ฉะนั้นจึงสามารถใช้ความเข้มข้นของ DEB ที่ต่ำกว่า คือ 0.1 ไมโครกรัม/มล. เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) ได้อย่างมั่นใจ เพราะจะไม่ทำให้เกิด false positive ในกลุ่มคนปกติ ซึ่งแตกต่างจากผู้ป่วย FA ที่ DEB ความเข้มข้นต่ำๆ หรือไม่ใช้ DEB ก็ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมได้ การวิเคราะห์ chromosome breakage เป็นงานตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับยืนยันการวินิจฉัยทางคลินิกในผู้ป่วย FA

Key Words : ● Chromosome breakage ● Fanconi anemia ● DEB

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2547;14:23-35.

ได้รับต้นฉบับ 29 พฤษภาคม 2546 และให้ตีพิมพ์ 15 สิงหาคม 2546

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ รศ.ดร.พิมพิชญา ปัทมสิริวัฒน์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศิริราชพยาบาล ถนนพหลโยธิน เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Fanconi anemia (FA) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรม ที่เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดภาวะไขกระดูกไร้ประสิทธิภาพชนิดถ่ายทอด (inherited bone marrow failure syndrome) โรค FA มีการถ่ายทอดแบบ autosomal recessive และมีอุบัติการณ์น้อยกว่า 1 คนในจำนวนเด็กที่คลอด 100,000 คน ผู้ป่วยโรคนี้มีโครโมโซมที่ไม่เสถียร (chromosome instability) เนื่องจากมีความผิดปกติในกลไกการซ่อมแซม DNA¹ FA เป็นความบกพร่องทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม aplastic anemia ถูกค้นพบโดยกุมารแพทย์ชาว Swiss ชื่อ Dr. Guido Fanconi² ในปี 1927 ลักษณะและอาการทางคลินิกที่สำคัญ ในผู้ป่วย คือ pancytopenia, bone marrow hypoplasia, congenital malformation, skin hyperpigmentation ที่เกิดจากการสะสมของสาร melanin จำนวนมาก (cafe'-au-lait spot) ความผิดปกติของโครงกระดูกทำให้มีรูปร่างเตี้ย และพบความผิดปกติของแขนและนิ้ว โดยเฉพาะที่นิ้วหัวแม่มือ และโครงกระดูกส่วนอื่น นอกจากนี้ ยังพบความผิดปกติอื่นๆ ได้หลายอย่าง เช่น ระบบประสาท, ไต และระบบขับถ่าย, อวัยวะสืบพันธุ์, ทางเดินอาหาร, ต่อมไร้ท่อและหัวใจ เป็นต้น

การตรวจพบทางโลหิตวิทยาในโรค FA ที่บ่งถึงไขกระดูกไม่ทำงาน ได้แก่ การพบ thrombocytopenia, macrocytosis และการมีระดับ HbF เพิ่มขึ้นกว่าปกติ นอกจากลักษณะสำคัญ 2 ประการ คือ ความพิการแต่กำเนิด และไขกระดูกล้มเหลวลูกกลม ผู้ป่วยโรค FA ยังมีเซลล์ที่มีความไวต่อสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น DNA cross-linking agent เช่น Mitomycin c, cisplatin และ DEB^{1,2,5,28,29}

FA แม้พบไม่บ่อยแต่มีความสำคัญ เพราะผู้ป่วย FA มักมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ง่ายกว่าคนทั่วไป จึงเป็น cancer susceptibility syndrome ประมาณร้อยละ 52 ของคนไข้เหล่านี้ มีความเสี่ยงต่อการเกิด Acute Myeloid Leukemia (AML) และ Myelodys-

plastic Syndrome (MDS) และความเสี่ยงนี้ มีสูงกว่าคนทั่วไปประมาณร้อยละ 10-15¹⁵ ผู้ป่วยอาจจะมีการดำเนินโรคไปสู่มะเร็งอย่างอื่นๆ ก็ได้แต่พบน้อยกว่า เช่น squamous cell carcinoma และมะเร็งระบบสืบพันธุ์สตรี เป็นต้น²⁷ บุคคลพาหะที่มี heterozygous mutation ของยีน FA จะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งมากน้อยอย่างไร ยังไม่ทราบอย่างชัดเจน

ในทางคลินิกผู้ป่วย FA ชนิดต่างๆ ที่มี genotype แตกต่างกันจะมีลักษณะทาง phenotype ที่แยกกันไม่ค่อยได้ ลักษณะอาการที่หลากหลายของ FA สามารถอธิบายได้จากการที่มียีนที่เกิดการผ่าเหล่าหลายแบบ คืออย่างน้อยมี 8 ยีน ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิด FA⁶⁻¹¹ ผู้ป่วย FA จึงสามารถถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม (complementation groups) ตามความผิดปกติของยีนที่พบได้แก่ผู้ป่วย กลุ่ม FA-A, B, C, D1, D2, E, F และ G โดยมียีนที่สัมพันธ์ ได้แก่ ยีน *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* และ *FANCG* ยีนเหล่านี้เข้าใจว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมให้มีการสร้างเม็ดเลือดที่ปกติ¹ และหน้าที่รักษาความเสถียรของ DNA *FANCC* เป็นยีนในกลุ่ม *FANC* ชนิดแรกที่ค้นพบเมื่อปี ค.ศ.1992⁷ ตำแหน่งของยีน *FANC* ต่างๆ¹³ ได้รวบรวมสรุปไว้ไว้ในตารางที่ 1 ประมาณการว่าความถี่ของการเกิด mutation ในยีน *FANC* ต่างๆ ในคนทั่วไปเท่ากับ 1 ใน 300 แต่ในประชากรเชื้อสาย Ashkenazi Jews และ Afrikans ในประเทศ Republic of South Africa ความถี่ของ *FANC* mutant genes เพิ่มขึ้นเป็น 1 ใน 150 และ 1 ใน 89 ตามลำดับ^{14,15} ในบรรดาผู้ป่วย FA พบว่า ร้อยละ 65 หรือ 2 ใน 3 ของผู้ป่วยเหล่านี้มี mutation ของยีน *FANCA* แต่ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงบนยีน *FANCA* ไม่มีตำแหน่งจำเพาะ ส่วน mutation ของ *FANCC* มีประมาณ ร้อยละ 10-15 ของผู้ป่วย FA และพบว่าร้อยละ 75 ของการเปลี่ยนแปลงบนยีน *FANCC* เป็นชนิด *FANCC: IVS4+4A → T*¹⁵ และ *FANCC:*

ตารางที่ 1 แสดงตำแหน่งบนโครโมโซมของยีนต่างๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิด Fanconi Anemia และผลผลิตโปรตีน

FA Genes	Chromosome Location	จำนวน Exons	โปรตีน	
			จำนวนกรดอะมิโน	M.W (KD)
Frequent phenotypes				
FANCA (65%)	16q 24.3	43	1,455	163
FANCC (15%)	9q 22.3	14	558	63
FANCG/XRCC9 (10%)	9 p13	14	622	68 (XRCC9)
Rarer phenotypes				
FANCD2	3 p25.3	44	1,451	155, 162
FANCE	6 p21-22	10	536	60
FANCF	11 p15	1	374	42 (ROM?)
FANCD1/BRCA2 (ยีนเดียวกัน)	13 q12.3	27	3,416	380 (BRCA2)
FANCB / BRCA2	13q12.3	27	3,416	380 (BRCA2)

ปรับปรุงจาก D'Andrea AD and Grompe M¹³

322ΔG¹⁶ deletion ที่ nucleotide ลำดับ 322 ของยีน FANCC

สำหรับหน้าที่ของยีน และผลผลิตโปรตีน ตลอดจนความผิดปกติที่นำไปสู่ FA ในขณะนี้เริ่มจะมีความเข้าใจในรายละเอียดมากขึ้นแล้ว และกำลังเป็นเรื่องร้อนที่ได้รับความสนใจอย่างมาก ซึ่งจะขอก้าวโดยสังเขป เพื่อให้เป็นความรู้ที่ก้าวหน้า และอาจมีประโยชน์ต่อนักวิจัยไทยที่สนใจต่อไป

การทำงานของโปรตีน FANC ชนิดต่างๆ มีการทำงานร่วมกับ โปรตีนผลิตภัณฑ์ของ breast cancer susceptibility genes คือ โปรตีน BRCA1 และ BRCA2 อย่างน่าสนใจ จากการที่ Howlett et al¹² เพิ่งค้นพบว่าผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่ม complementation groups FA-B และ FA-D1 ทั้งสองกลุ่ม มีการผ่าเหล่าเปลี่ยนแปลงภายในยีน BRCA2 ของทั้ง 2 alleles เรียกว่ามี biallelic mutation อยู่ภายในยีน BRCA2 เดียวกัน หากแต่ตำแหน่งของ mutation ของยีน BRCA2 ที่พบในผู้ป่วยกลุ่ม FA-B และ FA-D1 อยู่คนละที่กัน แสดงว่า แท้ที่

จริง FANCB , FANCD1 และ BRCA2 คือโปรตีนเดียวกัน และคือผลผลิตมาจากยีนๆ เดียวกัน (จึงใช้ชื่อ FANCB/BRCA2 หรือ FANCD1/BRCA2 ก็ได้) การค้นพบดังกล่าว ทำให้มีการวิจัยอย่างลึกซึ้ง เพื่อพิสูจน์ว่า BRCA1 และ BRCA2 กับโปรตีน FANC ต่างๆ มีการประสานงานที่เกี่ยวข้องกับ DNA break repair ร่วมกันด้วย

โปรตีน FANC 6 ชนิด (A, C, D2, E, F, G) มีการทำงานอย่างสัมพันธ์กันอยู่แล้ว^{13,19-23} โดยโปรตีน FANC A, C, E, F และ G จะทำงานโดยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม multisubunit nuclear complex ซึ่งกลุ่มโปรตีนนี้มีหน้าที่ช่วยให้เกิด monoubiquitination ของโปรตีน FANCD2 (หรือ D2) ทำให้โปรตีน D2 นี้ได้รับการกระตุ้นให้กลายเป็น active D2 ทำให้ D2 นี้มีทิศทางที่ต้องในการเข้าไปทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีน BRCA1 และ BRCA2 ใน nucleus ได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าโปรตีน FANCD2 และ BRCA1 ถูกตรวจพบได้ในตำแหน่งที่จุดๆ เดียวกันภายในนิวเคลียส การที่โปรตีน

ทั้งสองมี nuclear colocalization²⁰ นี่น่าจะพอเข้าใจได้ระดับหนึ่งว่ามันทำหน้าที่สามัคคีกันอย่างไรกันแน่ ดังนั้นเมื่อเกิด biallelic mutation ของ *FANC* genes หน่วยเหนือ (upstream genes เช่น *FANC A, C, E, F, G*) จะเป็นเหตุให้ การเกิด monoubiquitination ของโปรตีน D2 ถูกตัดตอน ซึ่งทำให้ D2 ไม่ถูกกระตุ้น และไร้ทิศทางเพื่อเข้าสู่ BRCA1 ฉะนั้นการทำหน้าที่อย่างสามัคคีของกลุ่มโปรตีน D2/BRCA1/BRCA2 ในการซ่อมบำรุง DNA (ที่มีการแตกหักเสียหาย หรือ DNA ที่เปลี่ยนแปลงผิดปกติ) จึงเป็นไปได้เหมือนปกติ กล่าวคือ ทำให้พบ DNA ที่แตกหักเสียหายด้วยสาร clastogen ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากการทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA break ของ BRCA1 และ BRCA2 (FANCD1) ต้องอาศัยปฏิสัมพันธ์ ร่วมกันกับ FANCD2 และกลุ่ม multisubunit nuclear complex (ACEFG) หน่วยเหนือ ดังกล่าวแล้ว

การวินิจฉัย FA ที่แม่นยำอาศัยการทดสอบ chromosome break test ซึ่งต้องมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ lymphocyte ก่อนและตรวจสอบความเสถียรของโครโมโซมในสภาวะพิเศษที่มีการเติมสารเคมีที่เป็น Clastogenic (chromosome breaking alkylating agents) เช่น Mitomycin C หรือ Diepoxybutane (DEB) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารนี้จะชักนำให้เกิดการทำลาย DNA จาก oxidative stress ที่เกิดจากการเติม DEB เมื่อ DNA ถูกทำลายเป็นบริเวณกว้างขึ้นจึงทำให้เห็นรอยแยกที่โครโมโซม เรียก chromosome break

จำนวนของ chromosome break จะเพิ่มขึ้นหากผู้ป่วย FA ได้รับสาร oxidative stress ต่างๆ มากขึ้น^{1-5,17,18} ความไม่เสถียรของโครโมโซม เกิดจากความบกพร่องของขบวนการซ่อมแซม DNA มีผลทำให้ การเปลี่ยนแปลงแตกหักเสียหายต่างๆ ที่เกิดขึ้นใน DNA ของผู้ป่วย พอกพูนมากขึ้นเพราะไม่มีการซ่อมบำรุงให้

กลับเป็น DNA ที่ปกติ จนในที่สุดจึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ไปได้ นอกจากนี้เซลล์ของ นอกจากการไวต่อสาร oxidative agents มากกว่าคนปกติแล้ว ผู้ป่วย FA ยังอาจมีความผิดปกติอื่นๆ ร่วมด้วย เช่นมีความผิดปกติของ cell cycle และเซลล์มีความโน้มเอียงจะเกิด apoptosis ได้ง่าย ซึ่งความผิดปกติต่างๆ ดังกล่าว เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของยีน *FANC* ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องซึ่งความรู้ปัจจุบันทราบว่ามีการทำงานใกล้ชิดกับยีน *FANC* เช่น *BRCA1, BRCA2, ATM, P53, RAD51* เป็นต้น^{13,19-23}

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์หา chromosome breakage ในผู้ป่วย FA เพื่อช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรค โดยการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร Diepoxybutane (DEB) ที่สามารถทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมในผู้ป่วย FA ได้ แต่ไม่ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมในคนปกติ ความเข้มข้นของ DEB ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ chromosome breakage ในคนไทยนี้ นอกจากมีประโยชน์ในการวินิจฉัย FA แล้วยังอาจจะใช้สำหรับวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการซ่อมแซม DNA ในโรคอื่นๆ อีกด้วย

แม้รายงานวิจัยนี้ เป็นการวิเคราะห์ระดับโครโมโซมเพื่อยืนยันการวินิจฉัย FA ให้ได้ตามหลักเกณฑ์มาตรฐานสากล และยังมีได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีน *FANC* ต่างๆ ก็ตาม แต่ความรู้จากงานวิเคราะห์วิจัยโครโมโซม มักจะเป็นประเด็นขั้นต้น ที่นำไปสู่การขยายการศึกษาในระดับยีนได้อย่างถูกต้องเหมาะสม เหตุนี้คณะวิจัยกลุ่มนี้จึงมีเจตจำนงอย่างชัดเจน สำหรับแผนโครงการศึกษาวิจัย Fanconi Anemia gene mutation analysis เพื่อประโยชน์สำหรับใช้เป็น molecular biomarker ของ FA และการค้นคว้าวิจัย Fanconi anemia-Breast cancer genes Interaction ในอนาคตอันใกล้

วิธีการ

การศึกษาในคนปกติ

เพื่อให้แพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยมั่นใจว่าไม่มี false positive จากการทดสอบ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบและตรวจวิเคราะห์ chromosome break ในคนปกติ 30 คน โดยใช้ความเข้มข้นของ DEB ตั้งแต่ 0, 0.01, 0.1, และ 0.2 ไมโครกรัม/มล. เพื่อพิสูจน์ว่าตัวอย่างคนไทยปกติจะไม่มี spontaneous chromosome break และไม่พบ chromosome break แม้จะใช้ DEB ในความเข้มข้นทดสอบเท่ากับหรือสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบกับผู้ป่วยและญาติผู้ป่วย

การศึกษาในผู้ป่วย Fanconi anemia และสมาชิกในครอบครัว

ทำการศึกษาวินิจฉัย รวมทั้งสิ้น 7 ครอบครัว (ตารางที่ 2) ซึ่งผู้ป่วยและญาติ มารับการตรวจ ณ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

Negative Control

ตัวอย่างเลือดคนปกติ ที่ใช้เป็น paired negative control แต่ละครั้งได้รับบริจาคจากบุคลากรในมหาวิทยาลัยมหิดล ในแต่ละครั้งของการทดสอบผู้ป่วย Fanconi anemia ต้องมีคนปกติเป็น negative control อย่างน้อย 1 ราย รวม control ทั้งหมด จำนวน 6 ราย เป็นเพศชาย 2 ราย เพศหญิง 4 ราย

ตัวอย่าง cord blood คนปกติที่ได้รับจาก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อใช้เป็น paired negative control ในการทดสอบกับ cord blood ของผู้ป่วย Fanconi anemia จำนวน 1 ราย

ส่วนตัวอย่างเลือดคนปกติ ที่ใช้ทดสอบ chromosome instability โดย DEB ได้รับบริจาคจาก นักศึกษา มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวนทั้งสิ้น 30 ราย อายุระหว่าง 20-38 ปี เป็นเพศชาย 14 ราย เพศหญิง 16 ราย

วิธีการศึกษา

1. การทดสอบสาร Diepoxybutane (ความเข้มข้น

DEB = 1 ไมโครกรัม/มล.)

ตัวอย่างตรวจแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วย Fanconi anemia และกลุ่มคนปกติ โดยแบ่งเป็น 4 การทดสอบ ได้แก่ DEB ที่มีความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มล. (ไม่ใส่ DEB), 0.01 ไมโครกรัม/มล., 0.1 ไมโครกรัม/มล., 0.2 ไมโครกรัม/มล. ในกลุ่มทดสอบคนปกติ สำหรับกลุ่มผู้ป่วยแบ่งเป็น 3 การทดสอบ ได้แก่ DEB ที่มีความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มล. (ไม่ใส่ DEB), 0.01 ไมโครกรัม/มล., 0.1 ไมโครกรัม/มล.

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้กรรมวิธีปลอดเชื้อโดยใช้ Heparin 1,000 IU 0.1 มล. ต่อดูด 5 มล. เป็นสารกันเลือดแข็ง เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ RPMI 1640 solution : Fetal bovine serum = 80:20 ผสมกับ Phytohemagglutinin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มล. จำนวน 0.5 มล. นำมากรองแบ่งใส่ขวดๆ ละ 10 มล. เมื่อนำมาใช้ให้ดูอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออกตามความเข้มข้นแล้ว label ไว้บนแต่ละขวดดังนี้

0 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ต้องดู culture media ออก
0.2 $\mu\text{g/mL}$ ดู culture media ออก 1.8 มล.
0.1 $\mu\text{g/mL}$ ดู culture media ออก 0.9 มล.
0.01 $\mu\text{g/mL}$ ดู culture media ออก 90 ไมโครลิตร

หยดเลือดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเขย่าเบาๆ แล้วนำไปอบที่ 37°C ใน CO₂ incubator (5% CO₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแต่ละขวดมาเติม DEB ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มล. ดังนี้ 0 ไมโครกรัม/มล. ไม่เติม DEB, 0.01 ไมโครกรัม/มล. เติม DEB 90 ไมโครลิตร, 0.1 ไมโครกรัม/มล. เติม DEB 0.9 มล., 0.2 ไมโครกรัม/มล. เติม DEB 1.8 มล. ตามลำดับ เขย่าแต่ละขวดแล้วนำมาอบที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์ใช้วิธีมาตรฐาน^{24,25} โดยสังเขป คือนำขวดเพาะเลี้ยงแต่ละขวดมาเติม Colchicine (Concentration=10⁻⁵

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเมตาเฟสและโครโมโซมที่พบการแตกหัก (break) ในผู้ป่วย FA ใน DEB ความเข้มข้นต่างๆ

ลำดับ ครอบครัว	สมาชิก ครอบครัว/เพศ	อายุ (ปี)	Specimen	จำนวนเมตาเฟสที่พบ break / DEB ($\mu\text{g/mL}$)			จำนวน break ที่ พบในแต่ละ ลาย	โครโมโซมคู่ ที่พบ Break
				0	0.01	0.1		
1	ผู้ป่วย/M	9	PB	4	ND	ND	5	6, 8, del 8(p), 2 กับ 10
			BM	- ^b	ND	ND	0	-
	น้องชาย/M	- ^a	PB	-	ND	ND	0	-
2	ผู้ป่วย/F	5	PB	-	5	3	11	3, 4, 6, 10 กับ X, 2 กับ 3 4, 10, 2 กับ X
			BM	-	1	3	6	7, 9 กับ 16, 1, 13 กับ X
	น้องชาย/M	1 วัน	Cord blood	-	-	-	0	-
	ตัวควบคุมลบ/F	46	PB	-	-	-	0	-
	ตัวควบคุมลบ/M	-	Cord Blood	-	-	-	0	-
3	ผู้ป่วย*							ไม่ได้ส่งตรวจ
	บิดา/M	27	PB	-	-	-	0	-
	มารดา/F	26	PB	-	2	-	2	7, 14
	น้องชาย/M	1 ปี 8 ด.	PB	-	-	-	0	-
	ตัวควบคุมลบ/M	41	PB	-	-	-	0	-
4	ผู้ป่วย/M	12	PB	-	-	1	4	4, 7, 11 และ 13 (อยู่ใน Metaphases เดียวกัน)
	ตัวควบคุม/F	49	PB	-	-	-	0	-
5	ผู้ป่วย/F	4 ปี 8 ด.	PB	-	1	-	1	7
	บิดา/M	-	PB	-	-	-	0	-
	มารดา/F	-	PB	-	-	-	0	-
	ตัวควบคุมลบ/F	30	PB	-	-	-	0	-
6	ผู้ป่วย/M	5	PB	-	-	-	0	-
	น้องชาย/M	2 ปี 7 ด.	PB	-	-	-	0	-
	ตัวควบคุมลบ/F	27	PB	-	-	-	0	-
7	ผู้ป่วย/M	5	PB	-	-	-	0	-
	ตัวควบคุม/F	42	PB	-	-	-	0	-

* ตัวผู้ป่วยไม่ได้ส่งตรวจ; PB = Peripheral blood; ND = Not done; BM = Bone marrow; a = ไม่รู้ข้อมูล; b = ไม่พบ chromosome break

M) 0.2 มล. ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 37°ซ ประมาณ 30 นาที นำขวดเพาะเลี้ยงถ่ายเซลล์ลงในหลอด centrifuge tube นำไปปั่น แล้วดูด supernatant ส่วนบนทิ้งไปให้เหลือตะกอนเซลล์ นำมาเติม hypotonic solution (KCl 0.075 M) ประมาณ 10 มล. นำไปปั่นที่ 37°ซ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย Carnoy fixative (Methanol : Glacial acetic acid 3:1) 4-5 ครั้ง ครั้งสุดท้ายปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้พอเหมาะก่อนหยดลงบนสไลด์ และย้อมแถบสี จากนั้นนำมาทำการนับและวิเคราะห์การแตกหักของโครโมโซม

3. การวิเคราะห์ผล

นำสไลด์ที่ย้อมแล้วมาวิเคราะห์การแตกหักของโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วย objective 100X และวิเคราะห์ยืนยันความแม่นยำด้วยเครื่องวิเคราะห์โครโมโซมอัตโนมัติ (Cytovision) โดยทำการวิเคราะห์โครโมโซมทั้งหมด 20 metaphases ต่อหนึ่งความเข้มข้นของ DEB ต่อหนึ่งตัวอย่างรวมตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการตรวจวิเคราะห์ เป็นผู้ป่วย, ญาติ และ negative control ดังนี้ : 23 ตัวอย่าง จากครอบครัว Fanconi anemia 7 ครอบครัว และจากคนปกติ 30 ตัวอย่าง รวม 53 ตัวอย่าง จำนวนเมตาเฟสที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดเท่ากับ 2,400 เมตาเฟส ในกลุ่มคนปกติ และ 1,260 เมตาเฟส ในกลุ่มครอบครัว Fanconi anemia รวมวิเคราะห์ทั้งหมด 3,660 เมตาเฟส

ผลการศึกษา

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสาร Diepoxybutane (DEB) ใน 4 กลุ่มทดสอบคือ 0, 0.01, 0.1, 0.2 ไมโครกรัม/มล. ในคนปกติ 30 ราย พบว่าในตัวอย่างเลือดจากคนปกติไม่พบการแตกหักของโครโมโซม (Chromosome breakage) ให้เห็นในทุกๆ ความเข้มข้นของ DEB และในทุกตัวอย่างทดสอบ ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้สาร DEB ในความเข้มข้นมากถึง 0.2 ไมโครกรัม/มล. ก็ยังไม่สามารถทำให้โครโมโซมของคนไทยปกติเกิด

มี breakage ได้ ฉะนั้นจึงสามารถใช้ความเข้มข้นของ DEB ที่ต่ำกว่า คือ 0.1 ไมโครกรัม/มล. เป็นตัวควบคุม negative control ได้อย่างมั่นใจ เพราะจะไม่ทำให้เกิด false positive ในกลุ่มคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรค Fanconi anemia แต่อย่างใด

สำหรับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่เป็น Fanconi anemia แยกตามครอบครัว ได้ดังนี้

ครอบครัวที่ 1 ในเลือดผู้ป่วย พบการแตกหักของโครโมโซมใน 4 เมตาเฟส โดยพบในโครโมโซมคู่ที่ 6, 8, del 8 (p-) อีก 1 เมตาเฟสพบการแตกหักของโครโมโซม 2 คู่ คือ คู่ที่ 2 กับ คู่ที่ 10 โดยเมตาเฟสทั้งหมดที่พบไม่ได้ใส่ DEB (0 ไมโครกรัม/มล.) ส่วนในไขกระดูก ผู้ป่วย, เลือดของน้องชายและเลือดตัวควบคุม (negative control) ไม่พบการแตกหักของโครโมโซมได้เลย สำหรับบิดาและมารดาไม่ได้ส่งตรวจ

ครอบครัวที่ 2 ในเลือดผู้ป่วย พบการแตกหักของโครโมโซมทั้งหมด 8 เมตาเฟส โดยพบในโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6, 2 กับ 3 (2 และ 3 อยู่ในเมตาเฟสเดียวกัน รูปที่ 1), X กับ 10 (X กับ 10 อยู่ในเมตาเฟสเดียวกัน) โดยเมตาเฟสที่พบนี้พบใน DEB ที่มีความเข้มข้นต่ำ คือ 0.01 ไมโครกรัม/มล. และพบการแตกหักของโครโมโซมคู่ที่ 4, 10, 2 และ X (2 และ X อยู่ในเมตาเฟสเดียวกัน) ใน DEB ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/มล. สำหรับในไขกระดูกผู้ป่วย จะพบการแตกหักของโครโมโซมทั้งหมด 4 เมตาเฟส โดยพบโครโมโซมคู่ที่ 7 ใน DEB ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/มล. และโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 กับ 16 (9 กับ 16 อยู่ในเมตาเฟสเดียวกัน), 13 กับ X (13 กับ X อยู่ในเมตาเฟสเดียวกัน) ใน DEB ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/มล. สำหรับเลือดตัวควบคุมลบ ไม่พบการแตกหักของโครโมโซมได้เลยในทุกความเข้มข้น ส่วนน้องชายเป็น cord blood และตัวควบคุมลบที่เป็น cord blood ก็ไม่พบการแตกหักของโครโมโซมได้เลยเช่นกัน บิดา, มารดาไม่ได้ส่งตรวจ

ครอบครัวที่ 3 สำหรับครอบครัวนี้ไม่สามารถได้

ตัวอย่างตรวจจากตัวผู้ป่วยเอง แต่ได้ทำการวิเคราะห์ใน บิดา, มารดาและน้องชาย และพบการแตกหักของ โครโมโซมในเลือดของมารดาพบทั้งหมด 2 เมตาเฟส พบ ในโครโมโซมคู่ที่ 7, 14 ใน DEB ความเข้มข้นต่ำคือ 0.01 ไมโครกรัม/มล. ส่วนในเลือดของบิดา, น้องชาย และตัวควบคุมลบไม่พบการแตกหักของโครโมโซมใดเลย

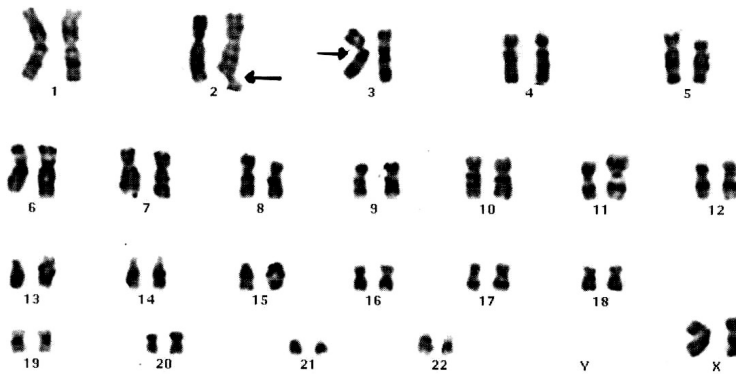
ครอบครัวที่ 4 ในเลือดผู้ป่วย พบการแตกหักของ โครโมโซมเพียง 1 เมตาเฟส แต่มีความผิดปกติใน โครโมโซมหลายคู่ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 4, 7, 11, 13 ทั้งหมดนี้อยู่ในเมตาเฟสเดียวกัน (รูปที่ 2) ซึ่งพบใน DEB ที่มีความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/มล. สำหรับตัวควบคุม

ลบไม่พบการแตกหักของโครโมโซมใดเลย ส่วนบิดา, มารดาไม่ได้ส่งตรวจ

ครอบครัวที่ 5 ในเลือดผู้ป่วยพบการแตกหักของ โครโมโซม 1 เมตาเฟส โดยพบในโครโมโซมคู่ที่ 7 ใน DEB ที่มีความเข้มข้นต่ำคือ 0.01 ไมโครกรัม/มล. สำหรับเลือดของบิดา, มารดาและตัวควบคุมลบ ไม่พบ การแตกหักของโครโมโซมใดเลย

ครอบครัวที่ 6 ในเลือดของผู้ป่วย น้องชาย และตัว ควบคุมลบ ไม่พบการแตกหักของโครโมโซมใดเลย สำหรับบิดา มารดา ไม่ได้ส่งตรวจ

ครอบครัวที่ 7 ในเลือดผู้ป่วย และตัวควบคุมลบ ไม่



รูปที่ 1 แสดงภาพ Karyogram ของผู้ป่วย Fanconi anemia ครอบครัวที่ 2 ที่ใช้ DEB ความเข้มข้น 0.01 $\mu\text{g/mL}$ และพบมี chromosome breakage ที่คู่ที่ 2 กับคู่ที่ 3



รูปที่ 2 แสดงภาพ Karyogram ของผู้ป่วย Fanconi anemia ครอบครัวที่ 4 ที่ใช้ DEB ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/mL}$ และพบ chromosome breakage บนคู่ที่ 4, 7, 11 และ 13

พบการแตกหักของโครโมโซมใดเลย สำหรับบิดา, มารดา ไม่ได้ส่งตรวจ

สรุปและวิจารณ์

ลักษณะสำคัญที่พบใน FA 3 ประการ คือ การพบ chromosome breakage, pancytopenia และ ความพิการทางร่างกายโดยกำเนิด แม้ว่าผู้ป่วย FA ส่วนหนึ่ง จะมีการแตกหักของ chromosome ได้เอง (เป็น spontaneous breaks) โดยไม่ต้องชักนำด้วย DEB แต่ FA ที่แท้จริงหลายรายก็ไม่มี spontaneous break ให้เห็น จึงจำเป็นต้องอาศัย clastogenic agent ดังกล่าว การศึกษาวิเคราะห์ chromosome breakage ใน ผู้ป่วย FA คนไทย โดยวิธี DEB testing นี้ ก็เพื่อนำเสนอวิธีการวินิจฉัยโรคนี้ให้เป็นไปตาม ข้อตกลงสากลของ The International Fanconi Anemia Registry (IFAR) (17,30,31,32) ว่าด้วยการวินิจฉัย FA ซึ่งให้ ถือว่าการตรวจพบ clastogen induced chromosome breakage เป็น เครื่องบ่งชี้ว่าผู้ป่วยเป็น FA จริง คือถือว่าเป็น diagnostic hallmark โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ผู้ป่วยที่สงสัย FA แต่ไม่มีความพิการทางร่างกาย (ร้อยละ 30 ของ FA ที่ไม่มีความพิการให้เห็น) ควรต้อง ยืนยันด้วย chromosome breakage test (หรือเรียก DEB testing ถ้าใช้ DEB ชักนำ) เพราะทำให้สามารถ แยก FA จาก acquired aplastic anemia หรือโรค อื่นๆ ที่คล้ายกันได้ นอกจากนี้ยังประโยชน์ในการตรวจ ครรภ์ (prenatal diagnosis) สำหรับมารดาที่มีแนวโน้ม เสี่ยงต่อการให้กำเนิดลูกที่เป็น FA อีกด้วย

ผู้วิจัยได้นำเสนอการศึกษาวิเคราะห์ chromosome breakage ภายหลังการกระตุ้นโดยสาร DEB (Diepoxybutane) ในความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.01, 0.1, 0.2 ไมโครกรัม/มล. ทั้งนี้เพื่อเป็นการนำเทคนิค ตรวจวิเคราะห์โครโมโซมมาประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ในการ ยืนยันการวินิจฉัย ผู้ป่วย Fanconi's anemia ใน คนไทยได้อย่างถูกต้องแม่นยำ การตรวจวิเคราะห์ที่ทำ

ในคนไทยปกติ 30 คน ก็เพื่อเป็นการพิสูจน์ความมีเสถียร ของ DNA ในตัวอย่างประชากรไทยในสภาวะที่มีสาร DEB ในความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ตรวจในผู้ป่วย Fanconi's anemia และแม้กระทั่งในความเข้มข้นของ DEB ที่สูงกว่าที่ทดสอบกับตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วย เพื่อ ให้มั่นใจว่าคนไทยปกติมีโครโมโซมที่มีเสถียรจริง เมื่อ เทียบกับผู้ป่วย FA และเพื่อประโยชน์ในการใช้เลือดคน ไทยปกติเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) ได้โดย ไม่มี DEB induced chromosome breakage

Fanconi anemia มีลักษณะสำคัญคือ มีโครโมโซม ที่ไม่เสถียร (instability) อันเนื่องมาจากมีความผิดปกติ ในกลไกการซ่อมแซม DNA เมื่อ DNA ถูกทำลายและมีความผิดปกติในการตอบสนองต่อสาร oxidative stress เช่น DEB ทำให้เกิดเป็นรอยแตกหักเสียหายเกิดขึ้นที่โครโมโซม (chromosome break) chromosome break ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย FA ก็เนื่องจากไม่สามารถซ่อมแซม DNA ที่แตกหักเสียหายได้

จากการศึกษาในเซลล์ของคนไทยปกติ 30 ราย ที่เติม DEB 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัม/มล. ไม่พบการแตกหักของโครโมโซมใดเลย ส่วนในผู้ป่วย FA จะพบการแตกหักของโครโมโซมในความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 ไมโครกรัม/มล. จำนวน 5 ราย อีก 2 ราย ไม่พบการแตกหักของโครโมโซมใดๆ จะเห็นว่าแม้ไม่ต้องใช้ DEB ในความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มล. ในผู้ป่วย FA ก็ สามารถเห็น chromosome break ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยรายที่ 1 ไม่ต้องชักนำด้วย DEB ก็ทำให้เห็น chromosome break แล้ว อย่างไรก็ตามจากการวิจัยนี้พบว่า ในบรรดาผู้ป่วย 7 รายที่แพทย์สงสัยในขั้นต้นว่าเป็น FA แต่การทดสอบ DEB testing ให้ผล บวก 5 ราย และให้ผลลบ 2 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 6 และ 7 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยสองรายดังกล่าว อาจจะมี ลักษณะทางคลินิก และ ทางโลหิตวิทยาที่เหมือน หรือ คล้าย FA แต่ไม่ใช่ FA ที่แท้จริง ความเจ็บป่วยของ ผู้ป่วยดังกล่าว อาจเกิดจากสาเหตุที่ไม่เกี่ยวข้องกับ

พันธุกรรม (acquired bone marrow failure) เช่น มารดาอาจได้รับ ยา สารเคมีบางอย่าง หรือ โดสรังสี ionizing radiation ในระหว่างมีครรภ์ หนึ่งในกรณีเช่น ผู้ป่วย 6 และ 7 นี้ ไม่สามารถตรวจสอบประวัติความเจ็บป่วยของครอบครัวโดยละเอียด และไม่ได้ เลือดจาก บิดา มารดา และ พี่ น้อง เพื่อการทดสอบ DEB testing

การตรวจวิเคราะห์ ที่รายงานในผู้ป่วยรายที่ 1 พบว่ามี spontaneous chromosome breaks ในเลือด แต่ไม่สามารถตรวจพบในไขกระดูก ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ล้มเหลว จากไขกระดูกทำได้ยากมากและ ได้จำนวน metaphases ที่สวยงามและยาวเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ chromosome breakage นั้นได้จำนวนน้อยในรายนี้ จึงทำให้ยังไม่สามารถค้นหา chromosome breakage พบในไขกระดูก

สำหรับมารดาของครอบครัวที่ 3 ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบ DEB testing ทั้งที่มารดาเป็นเพียง พาหะ ผลที่ได้นี้ น่าจะมีความหมายสำคัญได้สองประการ คือ (1) ใน Allele ที่มี mutated FANC gene นั้น ผลผลิตโปรตีนที่ได้ อาจจะมีความเสียหายเกิดขึ้นภายในบริเวณที่เป็นส่วนสำคัญมากต่อการทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA อย่างมีประสิทธิภาพ ฉะนั้น เมื่อโครโมโซมเกิดการแตกหักเสียหายจากการชักนำโดย DEB ในสถานการณ์ดังกล่าว โปรตีนที่ได้จาก FANC gene ที่ปกติบน allele ที่เหลือ อาจจะทำหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA ทดแทนกันไม่ได้ไม่สมบูรณ์เพียงพอ จึงทำให้เห็น breaks ปรากฏได้ และ (2) วิธีการของ DEB testing ที่รายงานนี้มีความไวพอสมควร เนื่องจากสามารถตรวจพบ chromosome breaks ได้ในคนที่พาหะบางรายได้ด้วย แต่ chromosome breaks ที่พบในพาหะน่าจะมีจำนวนน้อยกว่า เมื่อเทียบกับ homozygous FA ที่อยู่ในครอบครัวเดียวกัน

ในบรรดาโครโมโซมทั้ง 23 โครโมโซมคู่ที่พบ break ได้บ่อยในผู้ป่วยไทย ได้แก่ คู่ที่ 2, 4, 6, 7, 8, 10 และ

x ส่วนโครโมโซมคู่ที่ยังไม่พบว่ามี break เลยในการศึกษา คือ คู่ที่ 5, 12, 14, 15, และโครโมโซมในกลุ่ม E, F และ G ทั้งหมด ผู้ป่วยในครอบครัวที่ 1, 2 และ 4 มีความชุกของ chromosome break มากกว่าครอบครัวอื่นที่ศึกษา

หากเปรียบเทียบกับรายงานการวิเคราะห์ chromosome breakage test ในต่างประเทศโดย IFAR จะเห็นว่า ผลงานการวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ IFAR^{17,31,32} กล่าวคือ ตามรายงาน IFAR ที่ระบุว่า ผู้ป่วย FA มี จำนวนของ chromosome breaks/cell ภายหลังจากเซลล์ได้รับสาร DEB อยู่ในช่วง 1.3-23.9 เปรียบเทียบกับคนปกติที่มีค่า อยู่ระหว่าง 0-0.36^{17,32} คณะวิจัยนี้พบว่า ภายหลังจากที่เซลล์ของผู้ป่วยไทยได้รับสาร DEB จะตรวจพบว่ามี breaks/cell มากกว่า 1.3 หรือ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.6 (range 1-4) และตรวจไม่พบ break ในคนไทยปกติเลย

ผู้ป่วย FA มีความหลากหลายในการแสดงอาการ อาการ และช่วงอายุที่เริ่มแสดงอาการ ดังนั้นการทำ Chromosome breakage test จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการช่วยวินิจฉัยโรคนี้ และการทำ Chromosome breakage test จำเป็นต้องมีเลือดคนปกติทำควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) เพราะงานวิจัยนี้พิสูจน์แล้วว่า DEB ไม่ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมในคนปกติเลยในทุกความเข้มข้นที่ศึกษา ซึ่งแตกต่างจากผู้ป่วย FA ที่แม้ใช้ DEB ความเข้มข้นต่ำๆ หรือไม่ใช้ DEB ก็ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมได้ ข้อมูลเหล่านี้แพทย์สามารถใช้ประโยชน์ในการประกอบการวินิจฉัยโรค FA ร่วมกับลักษณะและอาการคลินิก และการทดสอบทางโลหิตวิทยาอื่นๆ เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจรักษา ตลอดจนให้การแนะนำครอบครัวของผู้ป่วยได้อย่างดีที่สุด นอกจากนี้ในอนาคตอันใกล้ การยืนยันการวินิจฉัย FA ให้แม่นยำมากที่สุด สามารถทำได้โดยการ ตรวจหาความผิดปกติของ FANC genes ต่างๆ ทั้ง 8 ยีนดังกล่าว โดยตรวจในผู้ป่วย ตลอดจน

สมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยเพื่อสืบค้นผู้เป็นพาหะของโรค และจะเป็นการนำไปสู่การป้องกันการถ่ายทอดของโรคทางพันธุกรรมนี้ในสมาชิกของครอบครัวเสี่ยงในรุ่นต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ ศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรวรรณ ตันไพจิตร ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การดูแลรักษาผู้ป่วย FA และ ส่งเสริมสนับสนุนโครงการนี้อย่างดียิ่ง

ขอบคุณ คุณปิยะพร แซ่ลิ้ม และคุณรัชนียานิธิพงษ์วนิช นักศึกษาปริญญาเอก ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคและค้นคว้าองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับ FA

เอกสารอ้างอิง

1. Lee GR. Pancytopenia, aplastic anemia and pure red cell aplasia. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer PJ, Rodgers MG, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology, Volume I*. 10th ed. Maryland: Williams & Wilkins 1999:1472-3.
2. Lynn and Dave Frohnmayer. *Fanconi anemia: A Handbook for families and Their Physicians*. 2nd ed. Eugene : Fanconi Anemia Research Fund, Inc., 1995.
3. Connor MJ, Ferguson-Smith AM. *Essential medical genetics: Chromosome Aberrations*. 3rd ed. London: Blackwell Science 1991.
4. Sum H, Puto HA. *Selected mendelian diseases*. In : Nora JJ, Fraser FC, eds. *Medical Genetics, principle and practice*. 3rd ed. Philadelphia : Lee & Febiger 1989:167-8.
5. Fanconi G : *Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA)*. I. Clinical aspects. *Semin Hematol* 1967;4:233.
6. Joenje H, Patel KJ. *The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia*. *Natl Rev Genet* 2001;2:446-57.

7. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. *Cloning of cDNAs for Fanconi's anemia by functional complementation*. *Nature* 1992;356:763-7.
8. Lo Ten Foe JR, et al. *Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA*. *Nature Genet* 1996;14:320-3.
9. de Winter JP, et al. *Isolation of a cDNA representing the fanconi anemia complementation group E gene*. *Am J Hum Genet* 2000;67:1306-8.
10. de Winter JP, et al. *The Fanconi anemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM*. *Nature Genet* 2000;24:15-6.
11. de Winter JP. *The Fanconi anemia group G gene FANCG is identical with XRCC9*. *Nature Genet* 1998;20:281-3.
12. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. *Science* 2002;297:606-9.
13. D'Andrea AD, Grompe M. *The Fanconi anemia/BRCA pathway*. *Nature Rev (online)* 2003;3:23-34. (www.Nature.Com/reviews/cancer)
14. Whitney MA, Jakobs P, Kaback M, Moses RE, Grompe M. *The Ashkenazi Jewish Fanconi anemia mutation: incidence among patients and carrier frequency in the at - risk population*. *Hum Mutat* 1994;3:339-41.
15. Verlander PC, et al. *Carrier frequency of the IVS4 +4A→T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population*. *Blood* 1995;86:4034-8
16. Gillio AP, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Auerbach AD. *Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene : an International Fanconi Anemia Registry study*. *Blood* 1997;90:105-10.
17. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. *International Fanconi Anemia Registry : Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity*. *Blood* 1989;73:391.
18. Auerbach AD. *Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis*. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman

- JG, Smith DR, eds. *Current Protocols in Human Genetics: Current Protocols*. New York 1994.
19. Witt E, Ashworth A. D-Day for BRCA2. *Science* 2002; 297:534.
 20. West SC. Cross-links between Fanconi anemia and BRCA2. *DNA Repair* 2003;2:231-4.
 21. MarX J. Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 2002;297:544-6.
 22. Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Sem Cancer Biol* 2003;13:77-82.
 23. Welsh PL, Owen KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 (review). *TIG* 2000; 16:69-74.
 24. Billie RB, Fromcis TF. Basic laboratory techniques in cell culture, U.S. Department of Health and Human Services, 1981:123-4.
 25. Gosden CM, Davidson C, Robertson M. Lymphocyte culture. In: Rooney DE, Czepnlkowaki BH, eds. *Human Cytogenetics Volume1 Constitutional analysis: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1992:30-40.
 26. บังอร ตัณห์เกตุร, ทัศนีย์ เล็บนาค และกานกานถ ชูปัญญา. ปฏิบัติการ Cytogenetics ในทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2527:17-20.
 27. Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol* 1996;53:99-110.
 28. Ishida R, Buchwald M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA cross-linking and alkylating agents. *Cancer Res* 1982;42:4000-6.
 29. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 1973;33:1829-36.
 30. Strathdee CA, Buchwald M. Molecular and cellular biology of Fanconi anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992;14:177-85.
 31. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: First report. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. *Fanconi anemia: clinical, cytogenetic, and experimental aspects*. Berlin: Springer-Verlag 1989:3-17.
 32. Auerbach AD, Ghosh R, Pollio PC, Zhang M. Diepoxybutane test for prenatal and postnatal diagnosis of Fanconi anemia. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. *Fanconi anemia: clinical, cytogenetic, and experimental aspects*. Berlin: Springer-Verlag, 1989:71-82.

Chromosome Breakage Induced by DEB in Thai Patients with Fanconi Anemia

Somporn Theingtat, Wichanun Yamkamol, Yodsaward Theptaranon* and Pimpicha Patmasiriwat

Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology; *Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University

Abstract: Finding of chromosome breakage is a diagnostic hallmark of Fanconi anemia (FA), a hereditary bone marrow failure syndrome with autosomal recessive inheritance. A defect in DNA repair mechanism leading to genome instability is an important etiology of FA. One strategic methodology to detect instability within chromosomes is a clastagenic introduction into the cell culture. Since the chromosome breakage analysis among Thai FA patients and standardized condition of the optimum clastagenic concentration used for the test among Thai patients and Thai normal subjects have never been reported, we then initiated this work in order to improve diagnostic accuracy of this rare but important genetic disease.

Lymphocytes from patients and their first degree relatives of seven families as well as lymphocytes from thirty normal Thais were cultured using modified standard culture procedure for chromosome preparation. Chromosome breaks were induced by different concentration of a clastagenic agent diepoxybutane (DEB) from 0.0 to 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Chromosome analysis were determined in the total of 2,400 metaphases from normal control subjects and 1,260 metaphases from FA patients and their family members. Result shows that chromosome breaks were easily observed when induced by low concentration of DEB (0.01 to 0.1 $\mu\text{g/mL}$) or even in uninduced culture (spontaneous breaks) in the majority FA patients. Five out of seven FA families exhibited chromosome breakage in various number of chromosomes. In contrast, no chromosome break was detectable in all thirty normal Thai samples even though DEB was used at the concentration as high as 0.2 $\mu\text{g/mL}$. We propose herein that chromosome breakage analysis is a useful technique and should be performed in all Thai patients suspicious of FA to confirm clinical diagnosis. DEB concentration at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ should be suitable for chromosome breakage analysis for FA in Thai people.

Key Words : ● Chromosome breakage ● Fanconi anemia ● DEB

Thai J Hematol Transf Med 2004;14:23-35.

ศติธรรมนำกำจัตมุดอ่น

อดเป็นคน ขานเป็นพระ
ทะกละเป็นเปรต เห็นอะไรก็ไม่วิเศษ
เข้าเห็นกิเลสของตน

พระครูปริยัติปัญญาธูธ
วัดโคงงาม อ.ด่านซ้าย จ.เลย