

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค Homozygous β -Thalassemia โดยการวิเคราะห์ชนิดของ Fetal Hb ด้วย Automated HPLC

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, ภัทรา ธนรัตนกร, ไชริส เอฟ สเตเกอร์, สุรสิทธิ์ ชมชื่น, วีระ ทองสงค์*,
พญัส จันทรประภาส*, พรณิ สิริวรรณธนาภา* และ สุปัตรา ศิริโชติยกุล*

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ และ *ภาควิชาสูติ-นรีเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ความเป็นมา: การวินิจฉัยก่อนคลอดเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถควบคุมและป้องกันการเกิดโรค homozygous β -thalassemia ได้ วิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ การตรวจ DNA จาก chorionic villi หรือ amniocytes จาก amniotic fluid แต่วิธีดังกล่าว มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และต้องลงทุนสูง และ β -thalassemia gene ที่พบในประเทศส่วนใหญ่เป็น β^0 -thalassemia gene เมื่อมารวมกันก่อให้เกิดโรค homozygous β -thalassemia ชนิดร้ายแรง และไม่มีการสร้าง Hb A ดังนั้น การตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A ในฟิตัสด้วยวิธี automated HPLC จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวินิจฉัยก่อนคลอดได้ **วัสดุและวิธีการ:** เลือดตัวอย่างของฟิตัส 40 ราย อายุ 18-22 สัปดาห์ ได้จากการทำ cordocentesis ของหญิงฝากครรภ์ที่ได้รับการตรวจกรองแล้ว และเสี่ยงที่จะให้บุตรเป็นโรค homozygous β -thalassemia นำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของ Hb ด้วย automated HPLC และตรวจหา β -globin gene mutation โดยวิธี direct β -globin gene sequencing **ผลการศึกษา:** การวิเคราะห์ชนิดของ Hb ด้วย automated HPLC พบฟิตัส 9 ราย ไม่มีสัดส่วนของ Hb A และ Hb A₂ มีแต่ Hb F และอีก 31 รายพบมีสัดส่วนของ Hb A ตั้งแต่ 0.5-7.4% ที่เหลือเป็น Hb F และไม่พบสัดส่วนของ Hb A₂ เช่นกัน ผลการตรวจ DNA sequencing ของฟิตัส 9 ราย ที่ไม่พบสัดส่วนของ Hb A เป็น homozygote ของ 4 bp deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) 2 ราย compound heterozygote ของ nonsense mutation ที่ codon 17 (A-T) กับ 4 bp deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) 4 ราย homozygote ของ splice site mutation ที่ IVS 1nt 1 (G-T) 2 ราย และเป็น compound heterozygote ของ non-sense mutation ที่ codon 35 (C-A) กับ 4 bp deletion codon 41/42(-CTTT) อีก 1 ราย ฟิตัสที่มี Hb A 1 รายมีค่าสัดส่วนของ Hb A เท่ากับ 0.5% พบเป็น compound heterozygote ของ 4 bp deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) กับ promoter mutation ที่ -28 (A-G), 20 ราย มีค่าสัดส่วนของ Hb A อยู่ระหว่าง 0.8-2.8% (1.82 ± 0.49) พบเป็น β -thalassemia trait ของ 4 bp deletion 12 ราย nonsense 17 mutation (A-T) 1 ราย IVS1nt1 (G-T) 3 ราย nonsense mutation ที่ codon 35 (C-A) 2 ราย และ promoter mutation ที่ -28 (A-G) 2 ราย ที่เหลืออีก 10 ราย มีค่า Hb A อยู่ระหว่าง 2.9-7.4% (4.9 ± 1.47) และไม่มีพบ β -thalassemia mutation **วิจารณ์และสรุป:** การวินิจฉัยก่อนคลอดด้วย วิธีวิเคราะห์ชนิดของ Hb ด้วย automated HPLC พบว่า homozygous β -thalassemia มีลักษณะ chromatogram ที่จำเพาะ คือ ไม่มีสัดส่วนของ Hb A และ ต่างจาก chromatogram ของฟิตัสที่เป็น β^+ -thalassemia, β -thalassemia trait และฟิตัสปกติชัดเจนและให้ผลสอดคล้องกับการตรวจ genotype โดยวิธี DNA sequencing วิธีการวิเคราะห์ fetal Hb ไม่ยุ่งยากมีความแม่นยำสูงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับหญิงตั้งครรภ์ในโครงการ การควบคุมและป้องกันการเกิดโรค homozygous β -thalassemia ชนิดร้ายแรงได้

Key Words : ● PND ● Homozygous β -thalassemia ● Fetal Hb typing ● HPLC

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543;10:91-101.

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2543 และให้ตีพิมพ์ 10 เมษายน 2543

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นพ. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50000

Homozygous β -thalassemia ที่พบในประเทศส่วนใหญ่ เป็นชนิดร้ายแรง ปีหนึ่งมีผู้ป่วยเกิดขึ้นใหม่ไม่น้อยกว่า 600 ราย¹ ขณะปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่เหมาะสม การรักษาที่ใช้อยู่โดยทั่วไปและนับว่าดีที่สุดในขณะนี้คือการให้เลือดอย่างสม่ำเสมอทุกเดือน และการให้ยาขับธาตุเหล็ก (Desferrioxamine) 5 วันต่อสัปดาห์²⁻³ วิธีการรักษาดังกล่าวแม้ว่าจะทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตยืนยาวขึ้น แต่ก็ทำให้ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ในระหว่างการรักษาบางครั้งยังมีโรคแทรกซ้อนเกิดขึ้นมากมาย นับว่าเป็นปัญหาเร่งด่วนทางด้าน health economics ของประเทศเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามโรคดังกล่าวสามารถป้องกันได้โดยการให้บริการทางพันธุศาสตร์ และส่วนหนึ่งของบริการดังกล่าวคือการวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อให้คู่เสี่ยงที่ให้บุตรเป็นโรค homozygous β -thalassemia มีทางเลือกในการขอรับบริการการรักษาทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมได้

วิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ การตรวจ DNA จากชิ้นรก (chorionic villi) ซึ่งได้จากการทำ chorionic villi sampling (CVS) เพื่อหาชนิดของ β -globin gene mutation โดย ต้องทราบ β -thalassemia mutation ในคู่เสี่ยงมาก่อน วิธีที่นำมาใช้ในประเทศไทยแล้วและได้ผลดี ได้แก่ dot blot hybridization⁴, reverse dot blot hybridization⁵⁻⁶, restriction endonucleas digestion และ PCR specific fragments analysis⁷ แต่วิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก นอกจากนี้ในประเทศไทยมี β -globin gene mutations ที่เป็นสาเหตุของโรคธาลัสซีเมียเกือบ 30 ชนิด⁸ ดังนั้นถ้าต้องใช้ DNA technique ให้สามารถตรวจครอบคลุมความผิดปกติทั้งหมดได้ เพื่อให้บริการทางพันธุศาสตร์ได้อย่างถูกต้องและวงกว้างคงต้องลงทุนสูง

แต่ในทางคลินิก การรวมตัวของ β -thalassemia gene ต่างๆ ทำให้เกิดโรค homozygous β -thalassemia ที่สำคัญ 2 ประเภทคือ homozygous β^0 -

thalassemia เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงและ β^+ -thalassemia เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดปานกลาง homozygous β^0 -thalassemia พบได้บ่อย⁹⁻¹⁰ จำเป็นต้องได้รับการควบคุมเป็นอันดับแรก

ในการรายงานครั้งนี้ขอแสดงให้เห็นว่าการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous β -thalassemia สามารถกระทำได้โดยการวิเคราะห์สัดส่วนของ fetal hemoglobin ด้วย automated HPLC ในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและให้ผลสอดคล้องกับการตรวจ β -thalassemia mutation ด้วยวิธี direct β -globin gene sequencing

วัสดุและวิธีการ

เลือดตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้มาจากเลือดฟัตัส อายุ 18-22 สัปดาห์ โดยการทำ cordocentesis ของหญิงเสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous β -thalassemia จำนวน 40 ราย หญิงเสี่ยงเหล่านี้

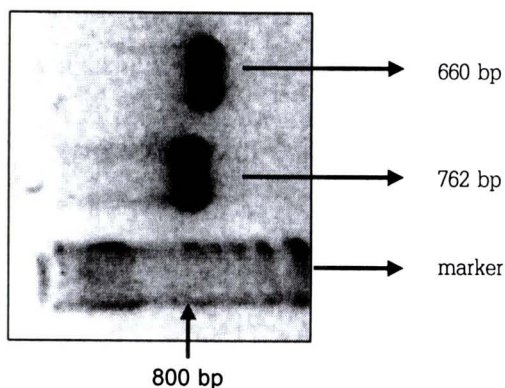
มาจากการตรวจกรองคู่สามีภรรยาที่มาฝากครรภ์ที่ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ด้วยวิธี 2 min OF¹¹ มีผลเป็นบวกทั้งคู่และได้รับการวัดสัดส่วนของ Hb A₂ ด้วยวิธี A2 test โดยคู่เสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็น homozygous β -thalassemia มีค่าสัดส่วนของ Hb A₂ อยู่ระหว่าง 4.5-8%¹²

Fetal Hb typing นำเลือดฟัตัสชนิด whole blood 5 ไมโครลิตรละลายใน hemolysis buffer จำนวน 1 ซีซี แล้วนำไปวิเคราะห์ในเครื่อง automated HPLC (Variant Hemoglobin Testing System, Bio-Rad)¹³

DNA sequencing DNA isolation นำเลือดของฟัตัสที่ได้จากการทำ cordocentesis 50 ไมโครลิตรใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ซีซี ล้างทำความสะอาดเม็ดเลือดโดยเติม 0.9% NaCl ลงไป 1 ซีซี ปิดฝาให้สนิท mix ด้วย vortex ให้เข้ากัน นำไปปั่นใน microcentrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีที่อุณหภูมิ

ห้อง ดูdsupernatant ที่ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปแยก DNA ด้วยวิธี Chelex extraction¹⁴

PCR- β -globin gene β -globin gene บริเวณ Exon1-2 (Exon3) ถูก amplify เพื่อศึกษาความผิดปกติของชนิดของ β -thalassemia ส่วนประกอบของน้ำยาต่างๆ ประกอบด้วย sterile deionised water 18 ไมโครลิตร concentrated glycerine 5 ไมโครลิตร 10 x Taq buffer 5 ไมโครลิตร dNTPs ของแต่ละตัวความเข้มข้น 1 mM 10 ไมโครลิตร primer sense และ antisense ความเข้มข้นของแต่ละตัว 5 μ M จำนวน 4 ไมโครลิตร Tag DNA polymerase 1:15 (5 u/ μ L) จำนวน 3 ไมโครลิตร DNA template 5 ไมโครลิตร รวมทั้งหมดเป็น 50 ไมโครลิตร แล้ว นำไปใส่เครื่อง thermal cycler (Gene Amp PCR System 9700) โดยตั้ง program ประกอบด้วย denaturation 94 °C 2.30 นาที ต่อด้วย program cycle ประกอบด้วย denaturation 94 °C 45 วินาที annealing 60 °C 1 นาที และ extension 72 °C 2 นาที 40 cycles และต่อด้วย extension ที่ 72 °C อีก 7 นาที นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจโดยนำไป run ใน 3% agarose gel electro-



รูปที่ 1 เป็นภาพถ่าย agarose gel electrophoresis ของ PCR products จากการ amplify β -globin gene บริเวณ Exon 1, 2 ซึ่งให้ PCR product ขนาด 762 bp และบริเวณ Exon 3 ซึ่งให้ PCR product 660 bp เพื่อใช้เป็น template สำหรับ DNA sequencing

phoresis และตรวจดู band ของ PCR ด้วย UV light β -globin gene ที่ได้จะมีขนาดเท่ากับ 762 base pairs (และ 660 bp ของ Exon 3) (รูปที่ 1) PCR product ที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ protocol ที่มากับชุดน้ำยา QIAquick PCR purification Kit (GIAGEN) PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นของ DNA ใน spectrophotometer ที่ 260 nm โดยผสมกับน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 : 50 จากนั้นนำไปตรวจลำดับของ DNA โดยวิธี cycle sequencing ตาม protocol ที่มากับชุดน้ำยา ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits ชนิด Big Dye Terminator ในเครื่อง ABI PRISM 310 Genetic Analyzer¹⁵

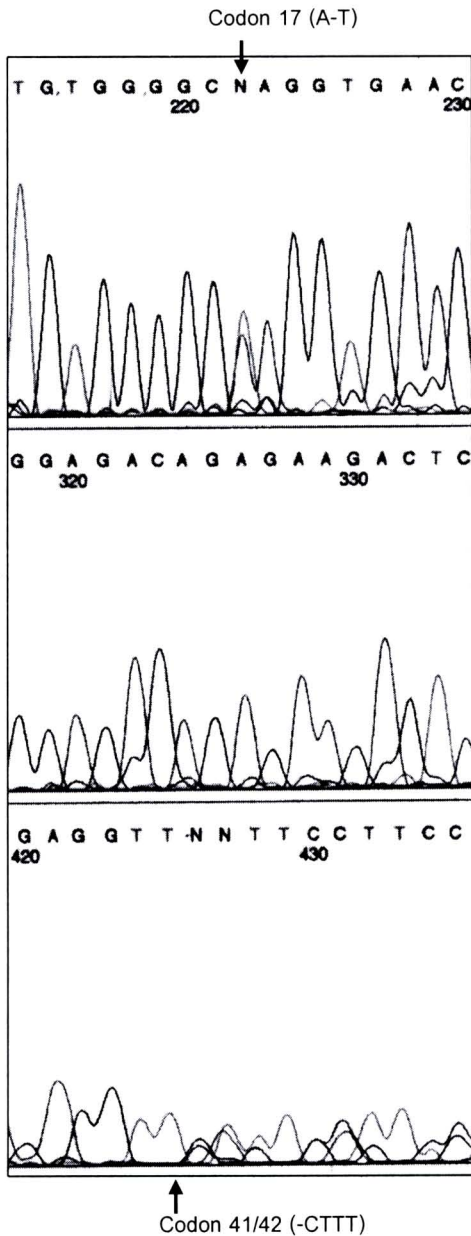
ผลการศึกษา

จากเลือดตัวอย่าง 40 ราย ตรวจด้วยวิธี automated HPLC แบ่งได้เป็น 2 พวก พวกที่ 1) 9 ราย ไม่พบ Hb A และ Hb A₂ มีแต่ Hb F พวกที่ 2) 31 ราย พบ Hb A กับ Hb F ไม่พบ Hb A₂ Hb A ที่พบในกลุ่มนี้มีค่าต่างๆ กัน โดยมีค่า Hb A ตั้งแต่ 0.5-7.4%

การศึกษา DNA sequencing เพื่อหาสาเหตุของ β -globin gene mutation ในฟีตัส 9 ราย ที่ไม่พบ Hb A เลย พบเป็น compound heterozygote ของ 4 base pairs deletion (bp) ที่ codon 41/42 (-CTTT) กับ nonsense mutation codon 17 (A-T) 4 ราย (รูปที่ 2) homozygote ของ 4 base pair deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) 2 ราย (รูปที่ 3) homozygote ของ splice site junction mutation codon IVS1nt 1 (G-T) 2 ราย และ compound heterozygote ของ codon 35(C-A) กับ 4 bp deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) 1 ราย (ตารางที่ 1)

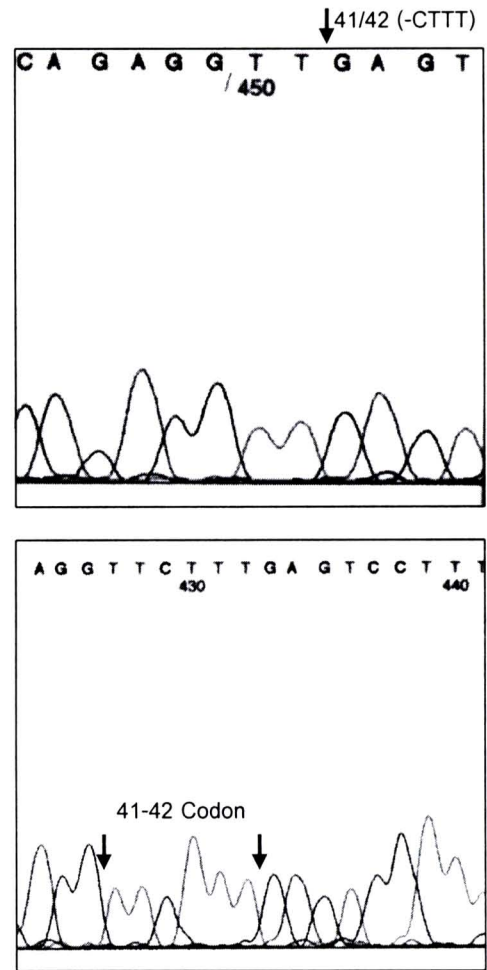
พวกที่ 2 Hb typing ประกอบ HbF กับ HbA 31 ราย พบ β -globin gene เป็น 3 แบบ คือ

แบบที่ 1 เป็น compound heterozygote ของ 4



รูปที่ 2 แสดงลำดับ DNA บางส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ β -globin gene บริเวณ Exon 1 และ 2 ของฟีตัสที่เป็น β^0 -thalassemia ชนิด compound heterozygous nonsense mutation ของ codon 17(A-T) กับ 4 bp deletion ที่ codon 41/42(-CTTT)

base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) กับ promoter mutation ตำแหน่งที่ -28 (A-G) 1 ราย (รูปที่ 4) ในรายนี้ chromatogram มีสัดส่วนของ Hb A



รูปที่ 3 เป็นรูปแสดงการวิเคราะห์ลำดับ DNA บางส่วนของ β -globin gene บริเวณ Exon 1 และ 2 ภาพบนเป็นภาพแสดงลำดับ DNA ตรงบริเวณ codon 41 และ 42 มีการขาดหายไปของ 4bp (-CTTT) เป็นลักษณะ homozygote ภาพล่างแสดงลำดับ DNA บริเวณ codon 41/42 ของฟีตัสปกติ

เท่ากับ 0.5% แบบที่ 2 DNA mutation เป็น heterozygous β -thalassemia พบ 20 ราย โดยเป็น 4 base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) 12 ราย โดยมีสัดส่วนของ Hb A ในแต่ละ chromatogram เท่ากับ 1.2, 1.9, 2.1, 1.7, 2.3, 1.3, 1.6, 2.3, 1.4, 1.8, 2.3 และ 2.2% ตามลำดับ 3 ราย เป็น heterozygote ของ

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของ β -globin gene mutation ที่พบในฟีตัส 40 ราย ในการวิเคราะห์ชนิดของ Hb ด้วยวิธี automated HPLC ที่ตรวจไม่พบสัดส่วนของ Hb A เป็น homozygous β^0 -thalassemia และที่พบ Hb A เข้าได้กับ β^+ thalassemia, β -thalassemia trait และฟีตัสปกติ

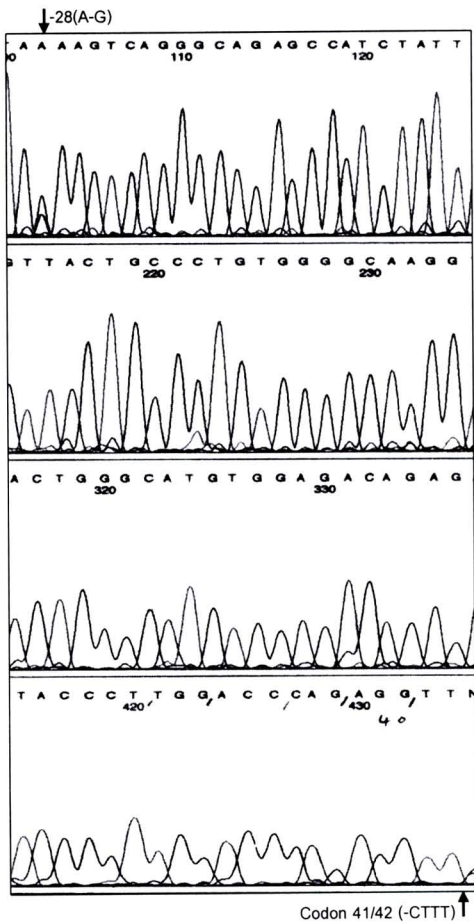
Genotype		HbA in %	Case
$\beta^{41/42(-CTTT)}$ $\beta^{41/42(-CTTT)}$	absent		2
$\beta^{17(A-T)}$ $\beta^{41/42(-CTTT)}$	absent		4
$\beta^{IVS1nt1(G-T)}$ $\beta^{IVS1nt1(G-T)}$	absent		2
$\beta^{35(C-A)}$ $\beta^{41/42(-CTTT)}$	absent		1
β^+ thalassemia			
$\beta^{-28(A-G)}$ $\beta^{41/42(-CTTT)}$	0.5		1
β -thalassemia trait (mean $\pm$ SD) (1.82 $\pm$ 0.49)			
$\beta^{41/42(-CTTT)}$ β^A	1.2, 1.9, 2.1, 1.7, 2.3, 1.3, 1.6, 2.3, 1.4, 1.8, 2.3, 2.2		12
$\beta^{IVS1nt1(G-T)}$ β^A	2.8, 0.8, 2.2		3
$\beta^{35(C-A)}$ β^A	2.2, 1.7		2
$\beta^{-28(A-G)}$ β^A	1.2, 1.8		2
$\beta^{17(A-T)}$ β^A	1.7		1
ฟีตัสปกติ (mean $\pm$ SD) (4.9 $\pm$ 1.47)			
β^A β^A	7.4, 5.6, 4.8, 5.1, 2.9, 3.1, 3.1, 5.3, 6.2, 5.4		10

splice site mutation ที่ IVS1nt1 (G-T) โดยมีค่าสัดส่วนของ Hb A เท่ากับ 2.8, 0.8 และ 2.2% นอกจากนี้พบ nonsense mutation ที่ codon 35 (C-A) 2 ราย ค่าสัดส่วนของ Hb A เท่ากับ 2.2 และ 1.7% และ promoter mutation ตำแหน่งที่ -28 (A-G) 2 ราย มีค่า Hb A เท่ากับ 1.2 และ 1.8% และพบ 1 รายเป็น nonsense 17 (A-T) และมีค่า Hb A เท่ากับ 1.7% แบบที่ 3 มี 10 ราย การศึกษา DNA sequencing ไม่พบความผิดปกติของ β -globin gene เข้าได้กับฟีตัสปกติ มีค่า Hb A เท่ากับ 7.4, 5.6, 4.8, 5.1, 2.9, 3.1, 3.1, 5.3, 6.2 และ 5.4% (ตารางที่ 1) ค่า mean $\pm$ SD ของสัดส่วน HbA ของ β -thalassemia trait 20 ราย เท่ากับ 1.82 $\pm$ 0.49% ต่ำกว่าค่า mean $\pm$ SD ของ Hb A ของฟีตัสปกติ

เท่ากับ 4.9 $\pm$ 1.47% (p < 0.001)

วิจารณ์

DNA sequencing primer ที่ใช้เพื่อ amplify β -globin gene ประกอบด้วย sense และ anti-sense primer คือ 5'AGAAGAGCCAAGGACAGGTAC G3' และ 5' TGCAATCATTCGTCTGTTTCCC 3' ตามลำดับ primer ทั้งสองชนิดใช้ในขบวนการ PCR เพื่อศึกษา β -globin gene mutation เริ่มจาก ตำแหน่งที่ -145 ไปจนถึง IVSII nt120 (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นบริเวณที่พบสาเหตุของ β -thalassemia ได้บ่อย PCR product ที่ได้จะมี nucleotide 762 base pairs ในชุดนี้ จะสามารถตรวจ mutation ที่พบบ่อยได้แก่ -28 (A-G),



รูปที่ 4 เป็นรูปแสดงลำดับ DNA บางส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ β -globin gene บริเวณ Exon 1 และ 2 ของฟีตัสที่เป็น β^+ -thalassemia เกิดจากการรวมตัวกันของ promoter mutation ที่ -28 (A-G) กับ 4 bp deletion ที่ codon 41/42(-CTTT)

17 (A-T), 26 (G-A) HbE, IVS1nt1 (G-T), IVS1nt5(G-C), 35 (C-A) และ 4 base pairs deletion (-CTTT) codon ที่ 41/42 ได้ และ primer ชุดที่สอง เพื่อใช้ตรวจ IVS2 nt 654 (C-T) sense primer คือ 5'TCCCTAATCTCTTTCTTT CAGG3' ส่วน anti-sense primer คือ 5'TTTTCCC AAGGTTTGAAGTAGC3' จะให้ PCR product เท่ากับ 660 base pairs โดยเริ่มจาก nucleotide

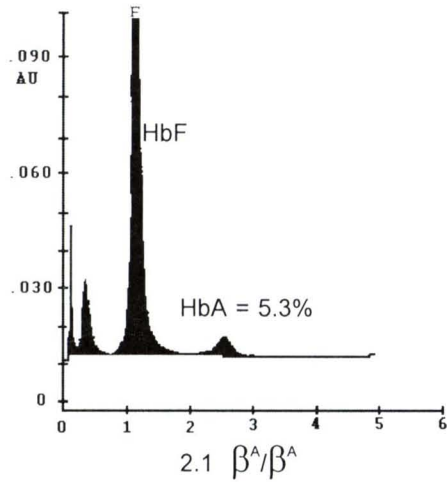
IVS2nt560 ใน intron 2 ผ่าน exon 3 ไปทางด้าน 3' ในส่วนของ polyadenylation จนถึง nucleotide ที่ 212

Direct β -globin sequencing ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก โดยนำ β -globin gene ที่ต้องการศึกษาไปทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า dye terminator cycle sequencing แล้วนำไปอ่าน ลำดับของ DNA base ในเครื่อง DNA Sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) ซึ่งจะอ่านลำดับ nucleotides จากด้าน 5' ไปยัง 3' ครั้งหนึ่งจะอ่านชัดเจนประมาณ 500 bases เรียงกันเมื่อนำวิธีนี้มาใช้ตรวจยืนยัน mutation จากเลือดของฟีตัส สามารถกำหนด genotype ของ thalassemia ที่พบบ่อยในเขตภาคเหนือได้ทั้งหมดและไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก

ในการศึกษาครั้งนี้พบฟีตัส 9 ราย ไม่มี Hb A มีแต่ Hb F และ β -globin gene mutation เกิดจากการรวมตัวกันของ β^0 -thalassemia trait ทั้งสิ้น ได้แก่ 4 base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT), non-sense mutation ที่ codon 17 (A-T) splice site mutation codon IVS 1 nt 1 (G-T) nonsense mutation ที่ codon 17 (A-T) และ codon 35 (C-A) β -thalassemia gene เหล่านี้ เป็น β^0 -thalassemia trait เมื่อมารวมกันก่อให้เกิดโรค homozygous β^0 -thalassemia ซึ่งเป็นโรค β -thalassemia ชนิดร้ายแรง ทั้งสิ้น สำหรับฟีตัส 31 ราย ที่มี Hb A เป็น β -thalassemia trait 20 ราย โดยเป็น β -thalassemia trait ของ gene 4 base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT), IVS1 nt 1 (G-T), nonsense mutation ที่ codon 35 (C-A), codon 17 (A-T) และ promoter mutation ตำแหน่งที่ -28 (A-G) แต่ไม่พบ β -thalassemia trait จาก mutation ของ nucleotide บริเวณ IVS II nt 654 β -thalassemia trait เหล่านี้มีค่าสัดส่วนของ Hb A อยู่ระหว่าง 0.8-2.8% และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1.8 \pm 0.5\%$ สัดส่วนของ Hb A ของกลุ่ม β -thalas-

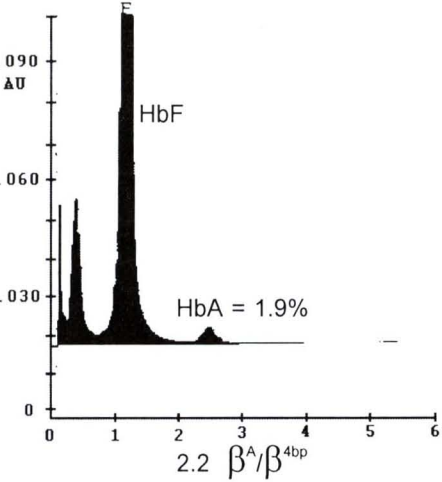
SAMPLE ID# 00000000000000000381

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	107.9	1.22	1522610
Ao	5.3	2.55	91131
TOTAL AREA			1613741
F	107.9%	A2	0.0%



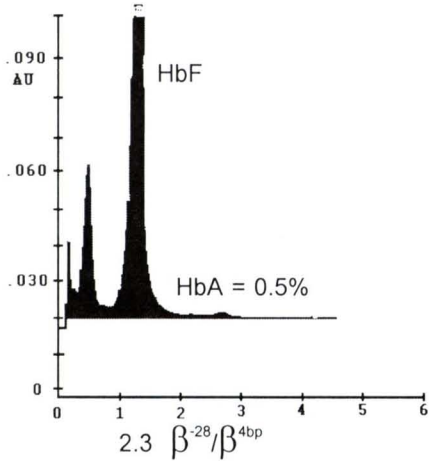
SAMPLE ID# 00000000000000000430

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	108.9	1.19	2711539
Ao	1.9	2.46	55188
TOTAL AREA			2711539
F	108.9%	A2	0.0%



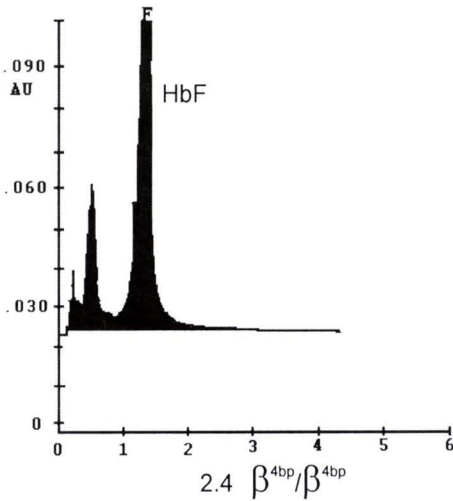
SAMPLE ID# 00000000000000000343

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	103.0	1.23	3360149
Ao	0.5	2.62	18685
TOTAL AREA			3360149
F	103.0%	A2	0.0%



SAMPLE ID# 00000000000000000304

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	103.0	1.22	2736819
TOTAL AREA			2736819
F	103.0%	A2	0.0%



รูปที่ 5 เป็นภาพ chromatogram ของการวิเคราะห์ fetal Hb ด้วยวิธี automated HPLC กับชนิดของ β -thalassemia mutation ของ fetus อายุ 18-22 สัปดาห์ ที่เสี่ยงจะเป็นโรค homogygous β -thalassemia

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่ง DNA mutation ของ β -globin gene ที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในบริเวณ Exon 1 และ Exon 2 (แถบสีเทา)

Sense primer			AGAAG	AGCCAAGGAC	AGGTACG	
	5'	TCCTAAGCCA	GTGCCAGAAG	AGCCAAGGAC	AGGTACGGCT	GTCATCACTT
	51	AGACCTACC	CTGTGGAGCC	ACACCCTAGG	GTTGGCCAAT	CTACTCCCAG
	101	GAGCAGGGAG	GGCAGGAGCC	AGGGCTGGGC	ATAAAGTCA	GGGCAGAGCC
	151	ATCTATTGCT	TACATTTGCT	TCTGACACAA	CTGTGTTAC	TAGCAACCTC
	201	AAACAGACAC	CATGGTGCAC	CTGACTCCTG	AGGAGAAGTC	TGCCGTTACT
17 (A-T)	251	GCCCTGTGGG	GCAAGGTGAA	CGTGGATGAA	GTTGGTGGTG	AGGCCCTGGG
IVS1nt1(G-T) IVS1nt5(G-C)	301	CAGGTTGCTA	TCAAGGTTAC	AAGACAGGTT	TAAGGAGACC	AATAGAACT
	351	GGGCATGTGG	AGACAGAGAA	GA CTCTTGGG	TTTCTGATAG	GCACTGACTC
	401	TCTCTGCCTA	TTGGTCTATT	TTCCCACCCT	TAGGCTGCTG	GTGGTCTACC
41/42(-CTTT)	451	CTTGGACCCA	GAGGTTCTTT	GAGTCCTTTG	GGGATCTGTC	CACCTCTGAT
	501	GCTGTTATGG	GCAACCTTAA	GGTGAAGGCT	CATGGCAAGA	AAGTGCTCGG
	551	TGCCTTTAGT	GATGGCCTGG	CTCACCTGGA	CAACCTCAAG	GGCACCTTTG
	601	CCACACTGAG	TGAGCTGCAC	TGTGACAAGC	TGCACGTGGA	TCCTGAGAAC
	651	TTCAGGGTGA	GTCTATGGGA	CCCTTGATGT	TTTCTTTCCC	CTTCTTTTCT
	701	ATGGTTAAGT	TCATGTCATA	GGAAGGGGAG	AAGTAACAGG	GTACAGTTTA
Anti-sense primer	751	GAATGGGAAA	CAGACGAATG	ATTGCATCAG		3'
		CCCTTT	GTCTGCTTAC	TAACGT		

semia trait มีค่าต่ำกว่าของฟีตัสปกติชัดเจน โดยฟีตัสปกติมี Hb A อยู่ระหว่าง 2.9 - 7.4% และมีค่าเฉลี่ย $4.9 \pm 1.47\%$ ($p < 0.001$) ฟีตัส 1 ราย มีค่า Hb A เท่ากับ 0.5% ฟีตัสรายนี้เป็น compound heterozygote ของ 4 base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) ร่วมกับ promoter mutation ตำแหน่งที่ -28 (A-G) 4 base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CTTT) เป็น β^0 -thalassemia gene ขณะที่ -28 (A-G) เป็น β^+ -thalassemia gene เมื่อมารวมกันทำให้เกิดเป็นโรค β^+ -thalassemia และมีลักษณะทางคลินิกจัดอยู่ในกลุ่ม thalassemia intermedia คือเป็นพวกโรค

ธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงปานกลาง

การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous β -thalassemia ที่นิยมใช้กันคือ การตรวจ β -thalassemia mutation ของ DNA ที่ได้จากชิ้นระหว่างอายุครรภ์ 9-12 สัปดาห์ ซึ่งได้มาจาก CVS มีหลายวิธี¹⁶⁻¹⁹ แต่วิธีตรวจที่พบมีรายงานบ่อยคือวิธี allele specific oligonucleotide hybridization (ASO) และวิธี reverse dot blot hybridization (RDB) ทั้งสองวิธีสามารถตรวจ β -thalassemia mutation ที่พบบ่อยได้ดี และผลการตรวจด้วยวิธีชนิดนี้ นอกจากทราบ mutation ที่แน่นอนของโรคธาลัสซีเมียแล้วทำให้มารดาที่

ตั้งครรภ์ด้วยโรคธาลัสซีเมียตัดสินใจขอรับบริการทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมได้ไว และผลการรักษาโดยวิธีหยุดการตั้งครรภ์ในช่วงเวลา 10-12 สัปดาห์มี morbidity ต่ำมารดาน้อย อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ DNA ด้วยวิธีข้างต้นมีข้อเสียที่สำคัญคือ ประเทศไทยมี β -thalassemia mutation เกือบ 30 ชนิด โดยวิธีดังกล่าวอาจไม่สามารถตรวจได้ครบทุก mutation ได้ และวิธีการข้างต้นมีขั้นตอนในการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ยุ่งยาก ในบางครั้ง PCR อาจไม่ได้ผลและประการสุดท้ายการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อจากมารดาอาจทำให้เกิด mis-diagnosis ได้²⁰ นอกจากนี้การลงทุนทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้หญิงตั้งครรภ์ทั่วประเทศได้รับบริการดังกล่าวคงต้องลงทุนสูงมาก

Fetal Hb typing ด้วยวิธี automated HPLC สามารถใช้ในการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous α -thalassemia-1 ได้ โดยโรคดังกล่าวไม่ปรากฏสัดส่วนของ Hb F และ Hb A มีแต่ Hb Bart's ต่างจากฟีตสปกติโดยฟีตสปกติมี Hb F และ Hb A และสัดส่วนของ Hb A ของฟีตสปกติอายุ 18-22 สัปดาห์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $4.7 \pm 0.9\%$ และไม่มี Hb A₂²¹

การวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับโรค homozygous β^0 -thalassemia โดยการวัดสัดส่วนของ Hb A ในฟีตสด้วยวิธี automated HPLC มีรายงานไว้ไม่มาก²²⁻²⁴ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องตรวจหา β -globin gene mutation ในคู่เสี่ยง ทั้งนี้เป็นเพราะ β -globin gene mutation ที่พบในประเทศไทยชนิดร้ายแรงส่วนใหญ่ มีค่าสัดส่วนของ Hb A₂ สูงชัดเจน (4.5-8%) และเป็น β^0 -thalassemia gene ข้อดีของวิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธี fetal Hb typing ด้วย automated HPLC คือมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากในการวิเคราะห์ชนิดของ fetal Hb เช่นนำ whole blood 5 ไมโครลิตรละลายใน hemolysis buffer แล้วนำเข้าเครื่อง automated HPLC วิเคราะห์ชนิดของ Hb ได้เลย ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 6 นาที และเลือดที่ได้จากการทำ cordocentesis สามารถตรวจ การปนเปื้อนเลือดจากมารดาได้ โดยวิธี acid elution stain

ท้ายที่สุดในการวิเคราะห์ fetal Hb typing ด้วย automated HPLC มีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าวิธี DNA technique ประมาณ 10-20 เท่าต่อราย จึงเหมาะสมและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้เพื่อการให้บริการควบคุมและการป้องกันโรค homozygous β -thalassemia ชนิดร้ายแรงในระดับประเทศได้

สรุป

จากการศึกษา ได้แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของ Hb A ในฟีตส มีความสัมพันธ์กับจำนวนโลกลัสของ β -globin ยีนที่ทำงานได้ การวิเคราะห์ fetal Hb ด้วยวิธี automated HPLC เพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous β^0 -thalassemia ให้ภาพ chromatogram จำเพาะคือ ไม่มี peak ของ Hb A มีแต่ peak ของ Hb F ซึ่งแตกต่างจาก β^+ -thalassemia, β -thalassemia trait และฟีตสปกติชัดเจน และให้ผลสอดคล้องกับชนิดของ genotype ของโรค β -thalassemia การวิเคราะห์ fetal Hb ด้วยวิธี automated HPLC มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก การแปลผลการวิเคราะห์ทำได้ง่าย สามารถใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของวิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อให้บริการกับหญิงตั้งครรภ์ที่อาจให้บุตรเป็นโรค β -thalassemia ชนิดร้ายแรงได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณอารีรัตน์ ปัญญาเขียว คุณโสภา ทาปัญญา ที่ช่วยงานด้านห้องปฏิบัติการ คุณอภิรดี ตรรกไพจิตร คุณรัตนภรณ์ เสธฤทธิ์ ที่ช่วยให้บริการคำปรึกษาทางพันธุศาสตร์กับหญิงฝากครรภ์เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย และคุณกนกวรรณ ปิ่นทอง ที่ช่วยพิมพ์เอกสารในการเผยแพร่ครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ประเวศ วะสี (ร่าง) แผนงานธาลัสซีเมียแห่งชาติ มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย พฤษภาคม 2539
2. Modell B. Total management of thalassemia major. Arch Dis Child 1997;52:487-500.

3. Porter JB. *Excerpta Haematologica. Current strategies and perspectives in thalassemia treatment.* Novartis Pharma Verlag. 90327 Nurnberg, Germany, 1999.
4. Winichagoon P, Fucharoen S, Siritanaratkuln, et al. Prenatal diagnosis for bata-thalassemia syndromes using HPR-labeled oligonucleotides probes at Siriraj Hospital. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1995;16(suppl 1):282-6.
5. Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia by reverse dot blot hybridization. *Prenat Diagn* 1999;19:428-35.
6. Muralitharan S, Srivastava A, Shaji RV, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia mutations using the reverse dot blot technique. *Nat Med J India* 1996;9: 70-1.
7. Chiou SS, Lin TC, Chang TT, et al. Prenatal and molecular diagnosis of beta-thalassemia major in Taiwan by naturally amplified created restriction sites. *Int J Hematol* 1993;59:1-8.
8. Laosombat V, Nopparat C, et al. Molecular basis of beta thalassemia in Thailand. *Sigapore Paediatr J* 1995;37:148-52.
9. Laig M, Sanguansersri T, et al. The spectrum of beta-thalassemia mutations in northern and north-eastern Thailand. *Hum Gen* 1988;84:47-50.
10. Sanguansersri T, Chayutimukul L. Globin synthesis in beta-thalassemic patients. *J Med Ass Thai* 1978;61:50-1.
11. Sanguansersri T, Phumyu N, Chomchuen S, et al. Screening for α -thalassemia-1 heterozygotes in expecting couples by the combination of a simple erythrocyte osmotic fragility test and a PCR based method. *Community Genetics* 1999;2:26-9.
12. Sanguansersri T, Tanpaiboon P, Wongmaeta S, et al. A2 test: A simple method for the screening of severe β -thalassemia trait. *Thai J Hematol Transf Med* 1999 (in press).
13. VARIANTTM Beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Diagnostics California, USA, 1994.
14. Kitsirisakul B, Steger HF, Sanguansersri T. Frequency of α -thalassemia-1 of the southeast Asian-type among pregnant women in northern Thailand determined by PCR technique. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1996;35:362-3.
15. ABI PRISM[®] DNA sequencing: Chemistry guides. Perkin-Elmer, Foster City CA., USA. 1995:1-3.
16. Gordkshakar AC, Lulla CP, Nadkarni AH, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia among Indians using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hemoglobin* 1997;21:421-35.
17. Chang J G, Lu JM, Huang JE, et al. Rapid diagnosis of beta-thalassemia by mutagenically separated polymerase chain reaction (MS-PCR) and its application to prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1995;91:602-7.
18. XU XM, Ma WF, Song LL, et al. Direct genotyping and prenatal diagnosis of beta-thalassemia in Chinese by polymerase chain reaction mediated restriction fragment length polymorphism method. *Clin Biochem* 1993;26:497-503.
19. Trent RJ, Le H, Yu B. Prenatal diagnosis for thalassemia in a multicultural society. *Prenat Diagn* 1998; 18:591-8.
20. Saxena R, Jain PK, Thomas E, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia: experience in a developing country. *Prenat Diagn* 1998;18:1-7.
21. Sanguansersri T, Steger HF, Kongtaveelert P, et al. Prenatal diagnosis of homozygous α -thalassemia-1 by fetal hemoglobin typing with high performance liquid chromatography. *Thai J Hematol Transf Med* 1999 (in press).
22. Rao VB, Natrajan PG, Lulla CP, et al. Rapid mid-trimester prenatal diagnosis of beta-thalassemia and other haemoglobinopathies using a non-radioactive anion exchange HPLC technique an Indian experience. *Prenat Diagn* 1997;17:725-31.
23. Maiavacca R, Tedeschi S, Mosca A, et al. Nonradioactive quantification of low concentrations of hemoglobin A by HPLC for midtrimester prenatal diagnosis of beta-thalassemia. *Clin Chem* 1992;38:1906-8.
24. Berdoukas V, Argnlle J, Cox W, et al. Prenatal diagnosis for hemoglobinopathies - 10 years experience using fetal blood sampling. *Pathology* 1993;25:48-51.

Prenatal Diagnosis of Homozygous Beta-Thalassemia by Fetal Hb Typing Analysis Using Automated HPLC

Sanguanserm Sri T, Tanaratana Korn P, Steger HF, Chomchuen S, Tongsong T*, Chanprapas P*, Sirivantanapa P*, and Sirichotiyakul P*

Department of Pediatrics, *Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Background: Prenatal diagnosis is one of the methods used for prevention and control of homozygous β -thalassemia. The method usually used is DNA analysis from chorionic villi and amniocytes, which are quite complicated and expensive. However, in Thailand the causes of this disease are mostly due to β^0 -thalassemia genes, which cannot produce Hb A. Therefore, the measurement of Hb A percentage by automated HPLC could be an other helpful prenatal diagnostic method. **Materials and methods:** Forty pregnant women, at a gestational age of between 18-22 weeks were chosen. They were at risk of delivering a child with homozygous β -thalassemia. Cordocentesis was performed and fetal blood analyzed for Hb typing by automated HPLC. The β -globin gene mutation was demonstrated by direct β -globin gene sequencing. **Results:** There were 9 fetuses which had Hb F only. The DNA sequencing analysis of them showed 2 fetuses were homozygote of 4 bp deletion at codon 41/42 (-CTTT), 4 were compound heterozygote of nonsense mutation at codon 17 (A-T) and 4 bp deletion at codon 41/42 (-CTTT), 2 were homozygote of splice site mutation at IVS1nt1(G-T) and one fetus was compound heterozygote of nonsense mutation at codon 35 (C-A) and 4 bp deletion at codon 41/42 (-CTTT). Thirty one fetuses showed Hb A in the HPLC chromatograms with the proportion from 0.5 to 7.4%. One fetus with Hb A of 0.5% was a case of compound heterozygous promoter mutation at -28 (A-G) and 4bp deletion of codon 41/42 (-CTTT). Twenty fetuses were β -thalassemia trait where 12 were 4 bp deletion at codon 41/42 (-CTTT), 3 were IVS1nt1(G-T), 2 were nonsense mutation of codon 35 (C-A), 2 were promoter mutation at position -28 (A-G) and 1 was nonsense mutation at codon 17 (A-T). The proportion of Hb A of this group was 0.8-2.8% (1.82 ± 0.49). The other 10 fetuses showed Hb A of 2.9 - 7.4% (4.9 ± 1.5) that had normal DNA sequencing. **Conclusion:** Prenatal diagnosis of homozygous β -thalassemia by Hb typing analysis using automated HPLC showed an absence of Hb A, which was the characteristic finding. The results were confirmed by genotypes from DNA sequencing. It was suggested that the analysis of fetal hemoglobin is simple, inexpensive and accurate for prenatal diagnosis. Therefore this method would be the most appropriate for the prevention and control of homozygous β -thalassemia throughout Thailand.

Key Words : ● PND ● Homozygous β -thalassemia ● Fetal Hb typing ● HPLC

Thai J Hematol Transf Med 2000;10:91-101.

ความทุกข์เกิด

ความทุกข์เกิดที่จิต
ความทุกข์จะไม่โผล่
ความทุกข์เกิดไม่ได้

เพราะทำผิดเมื่อผัสสะ
ถ้าไม่โง่เมื่อผัสสะ
ถ้าเข้าใจเรื่องผัสสะ
(พุทธทาสภิกขุ)