

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคบิดาธาลัสซีเมียเมเจอร์โดยวิธี อัลลีลสเปซิฟิกพีซีอาร์ร่วมกับการวิเคราะห์เฟรมเวอร์คของยีนบีตาไกลบิน

สุพรรณ พุเจริญ¹, ถวัลย์วงศ์ รัตนศิริ², กุลนภา พุเจริญ³, ณัฐยา แซ่เอ็ง³,
กนกวรรณ แสนไทยสุริยา³

บทคัดย่อ

ได้ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคบิดาธาลัสซีเมียเมเจอร์ในครอบครัวหนึ่งซึ่งพ่อและแม่ต่างก็เป็นพาหะบิดาธาลัสซีเมียทั้งคู่ และมีบุตรชายเป็นโรคบิดาธาลัสซีเมียเมเจอร์หนึ่งคน จากการตรวจดีเอ็นเอโดยวิธีอัลลีลสเปซิฟิก โพลีเมอเรสเชนรีแอคชันพบว่ายีนบิดาธาลัสซีเมียในแม่เกิดจากความผิดปกติชนิด IVS1#5 G-C แต่ไม่พบชนิดของความผิดปกติในพ่อ จึงได้ใช้วิธี linkage analysis แทน โดยตรวจวิเคราะห์เฟรมเวอร์คของยีนบีตาไกลบินในพ่อ แม่และบุตรชายโดยการตรวจ *Ava II* และ *BamH I* polymorphisms ในกลุ่มยีนบีตาไกลบินโดยวิธีพีซีอาร์ พบว่า ยีนบิดาธาลัสซีเมียในพ่อที่ไม่ทราบชนิดของความผิดปกติสัมพันธ์กับยีนบีตาไกลบินเฟรมเวอร์ค 1 (*Ava II* +, *BamH I* +) ส่วนยีนบิดาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C ในแม่นั้นสัมพันธ์กับยีนบีตาไกลบินเฟรมเวอร์ค 3 (*Ava II* -, *BamH I* +) เมื่อตรวจตัวอย่างขึ้นเนื่อรกพบว่ามียีนบีตาไกลบิน เป็นชนิดเฟรมเวอร์ค 1 และ 3 และตรวจพบยีนบิดาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C ด้วยผลการตรวจจึงสามารถสรุปได้ว่าทารกในครรภ์เป็นโรคบิดาธาลัสซีเมียเมเจอร์ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการณีที่ไม่ทราบชนิดของความผิดปกติของยีน การตรวจวิเคราะห์เฟรมเวอร์คของยีนบีตาไกลบินในครอบครัวผู้ป่วยโดยวิธีพีซีอาร์และหาความสัมพันธ์กับยีนบิดาธาลัสซีเมียในครอบครัวผู้ป่วย เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคบิดาธาลัสซีเมียเมเจอร์

คำรหัส : บิดาธาลัสซีเมียเมเจอร์, อัลลีลสเปซิฟิกพีซีอาร์,
บีตาไกลบินยีนเฟรมเวอร์ค, การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์

¹ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์

² ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์

³ ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract : Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia Major Using Allele Specific Polymerase Chain Reaction and Analysis of β -Globin Gene Framework

Supan Fucharoen¹, Thawalwong Ratanasiri², Goonnapa Fucharoen³,
Natthaya Sae-ung³, Kanokwan Sanchaisuriya³

Prenatal diagnosis of β -thalassemia major was carried out in one Thai family. Both father and mother were heterozygous for β -thalassemia and a previous affected child was a patient with transfusion dependent β -thalassemia major. The β -globin gene mutations causing β -thalassemia in this family were examined using allele specific polymerase chain reaction (ASPCR). The maternal β -thalassemia gene was caused by a G-C mutation at IVS1#5 of β -globin gene but no paternal β -globin gene mutation could be detected. An alternative approach using linkage analysis was then carried out by analysis of the *Ava II* and *BamH I* polymorphisms in β -globin gene cluster using PCR followed by restriction digestion. It was found that an unknown β -thalassemia gene in the father was linked to β -globin gene framework 1 (*Ava II* +, *BamH I* +) and the IVS1#5 G-C in the mother was associated with β -globin gene framework 3 (*Ava II* -, *BamH I* +). Analysis of CVS sample showed the heterozygosity of β -globin genes framework 1 and 3 and the IVS1#5 G-C mutation was also detected. The fetus was therefore diagnosed as a patient with homozygous β -thalassemia. The result from this study demonstrated that when an unknown β -thalassemia gene was encountered at prenatal diagnosis, linkage analysis of β -globin gene frameworks in a patient family could be an effective alternative approach.

Key words : β -thalassemia major, allele specific polymerase chain reaction,
 β -globin gene framework, prenatal diagnosis

¹ Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences,

² Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine,

³ Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

ปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือโฮโมไซกัสปีตาธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในประเทศไทย ผู้ป่วยมักมีอาการโลหิตจางรุนแรงและเรื้อรัง รักษาไม่หายขาด^{1,2} จึงเป็นโรคหนึ่งที่เป็นเป้าหมายของการรณรงค์เพื่อการควบคุมและป้องกันโดยการให้การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่เสี่ยง³ โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวนี้มักนิยมใช้การตรวจดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหายีนปีตาธาลัสซีเมียโดยตรงในช่วงไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์⁴ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบชนิดของมิวเตชันที่เกิดขึ้นในพ่อและแม่ก่อนเสมอ แต่เนื่องจากยีนปีตาธาลัสซีเมียที่พบในประชากรไทยมีหลายชนิดแต่ละชนิดมีความถี่ของการตรวจพบแตกต่างกันและยังมียีนธาลัสซีเมียอีกจำนวนหนึ่งที่ยังไม่ทราบชนิดของความผิดปกติ⁵⁻⁷ การตรวจหายีนปีตาธาลัสซีเมียเหล่านี้จึงยุ่งยากและหากไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีการต่างๆ ที่ใช้อยู่ จะต้องใช้วิธีตรวจสอบลำดับเบสของยีนโดยการทำ DNA sequencing ต่อไป⁸ ซึ่งยุ่งยากและใช้เวลานาน ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าในกรณีที่ไม่มีทราบชนิดของความผิดปกติของยีนในพ่อและแม่ การตรวจหา DNA polymorphism ในกลุ่มยีนปีตาโลบินซึ่งใช้กำหนด β -globin gene framework⁹ ในครอบครัวผู้ป่วย เป็นวิธีทางอ้อมวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้ง่ายกว่า และสามารถใช้ในการทำ linkage analysis เพื่อให้การวินิจฉัยโรคปีตาธาลัสซีเมียของทารกในครรภ์ได้

วิธีการศึกษา

1. ครอบครัวผู้ป่วย

รูปที่ 1 แสดงครอบครัวผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งคู่สามี ภรรยา ต่างก็เป็นพาหะปีตาธาลัสซีเมียทั้งคู่และมีบุตรชายอายุ 4 ขวบป่วยเป็นโรคปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ที่ต้องรับการรักษาโดยการให้เลือดเป็นประจำ ภรรยากำลัง

ตั้งครรภ์บุตรคนที่สองได้ 12 สัปดาห์ ขณะมาขอรับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เนื่องจากทารกในครรภ์มีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคสมาชิกในครอบครัวนี้ทุกคนได้รับการเจาะเลือดและตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและใช้วิธีมาตรฐาน¹⁰

2. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและเนื้อกระดูกด้วยวิธีมาตรฐาน การตรวจยีนปีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในคนไทยใช้วิธี allele specific polymerase chain reaction (ASPCR)^{11,12} การตรวจวิเคราะห์ *Ava II* และ *BamH I* polymorphism ในกลุ่มยีนปีตาโลบินและการกำหนด เฟรมเวอร์คของยีนปีตาโลบิน ใช้วิธีพีซีอาร์แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ¹³ การตรวจ Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism เพื่อดูความสัมพันธ์ทางสายเลือดและตรวจดูการปนเปื้อนของดีเอ็นเอแม่ในตัวอย่างทารก เลือกตรวจ locus D1S80 ด้วยวิธีพีซีอาร์เช่นกัน¹⁴

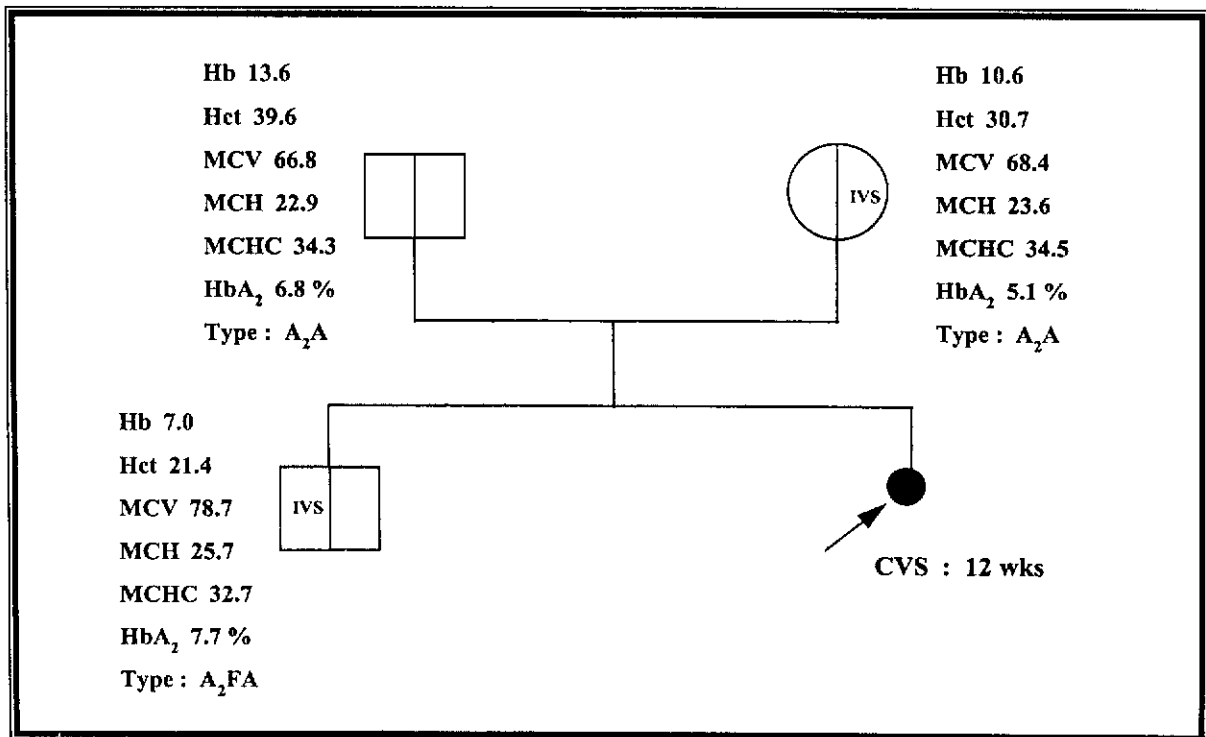
ผลการศึกษา

1. ข้อมูลทางโลหิตวิทยาของครอบครัวผู้ป่วย

รูปที่ 1 เป็นพงศาวลีแสดงค่าต่างๆ ทางโลหิตวิทยาที่ตรวจได้ในครอบครัวผู้ป่วย ปริมาณ HbA₂ ในพ่อและแม่เท่ากับ 6.8% และ 5.1% ตามลำดับ โดยมีค่า MCV และ MCH ต่ำ เป็นข้อมูลที่สามารถให้การวินิจฉัยได้ว่าทั้งสองคนเป็นพาหะปีตาธาลัสซีเมีย ส่วนบุตรชายอายุ 4 ขวบ ตรวจพบฮีโมโกลบินชนิด A₂FA มีภาวะโลหิตจางชัดเจนแสดงว่าเป็นปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์การตรวจพบ HbA ในบุตรชายนี้อาจแสดงว่าผู้ป่วยเป็นโฮโมไซกัสของปีตาธาลัสซีเมียและปีตาบวธาลัสซีเมีย หรืออาจเป็นโฮโมไซกัสปีตาธาลัสซีเมียที่ได้รับ

HbA มาจากการให้เลือดเนื่องจากผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือดเป็นประจำ ขณะที่มาโรงพยาบาลผู้ป่วยเป็นแม่กำลังตั้งครรภ์บุตรคนต่อไปได้ 12 สัปดาห์ ทารกในครรภ์จึงมีความเสี่ยงที่จะเป็น

ปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ร้อยละ 25 และต้องการรับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์หลังจากได้รับคำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมแล้ว

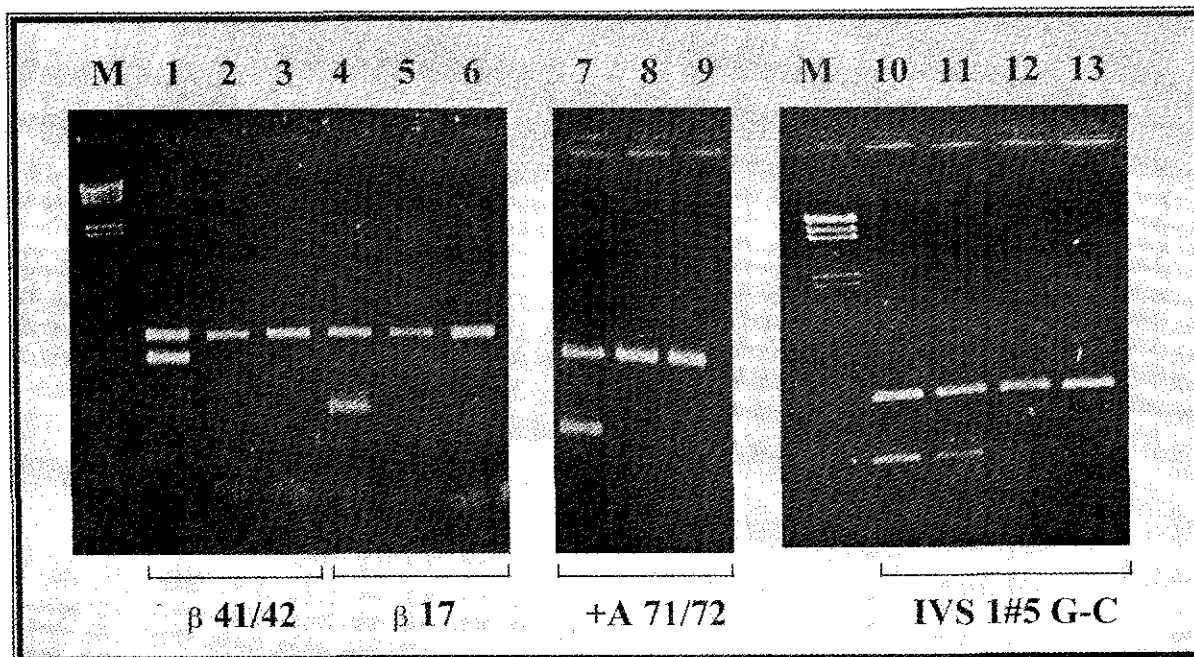


รูปที่ 1 ครอบครัวผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และข้อมูลทางโลหิตวิทยาที่ตรวจได้ เครื่องหมายลูกศรชี้ทารกในครรภ์ที่ต้องการตรวจวินิจฉัยโรคปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์โดยการตรวจ chorionic villus sampling (CVS)

2. การตรวจหายีนปีตาธาลัสซีเมีย

รูปที่ 2 เป็นตัวอย่างที่แสดงผลการตรวจค้นหายีนปีตาธาลัสซีเมียในครอบครัว โดยวิธีอัลลีสเปซิฟิกโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (ASPCR) โดยเน้นตรวจยีนปีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทย ซึ่งทำให้ตรวจพบว่าผู้เป็นแม่เป็นพาหะของปีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C แต่

ตรวจไม่พบมิวเตชันในพ่อ ยีนปีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C นี้ ตรวจพบในบุตรชายด้วย ข้อมูลนี้แสดงว่ายีนปีตาธาลัสซีเมียในพ่อนี้อาจเป็นชนิดพบได้ไม่บ่อย (rare type) หรือเป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โดยการตรวจหายีนปีตาธาลัสซีเมียโดยตรงจึงไม่สามารถทำได้ในครอบครัวนี้

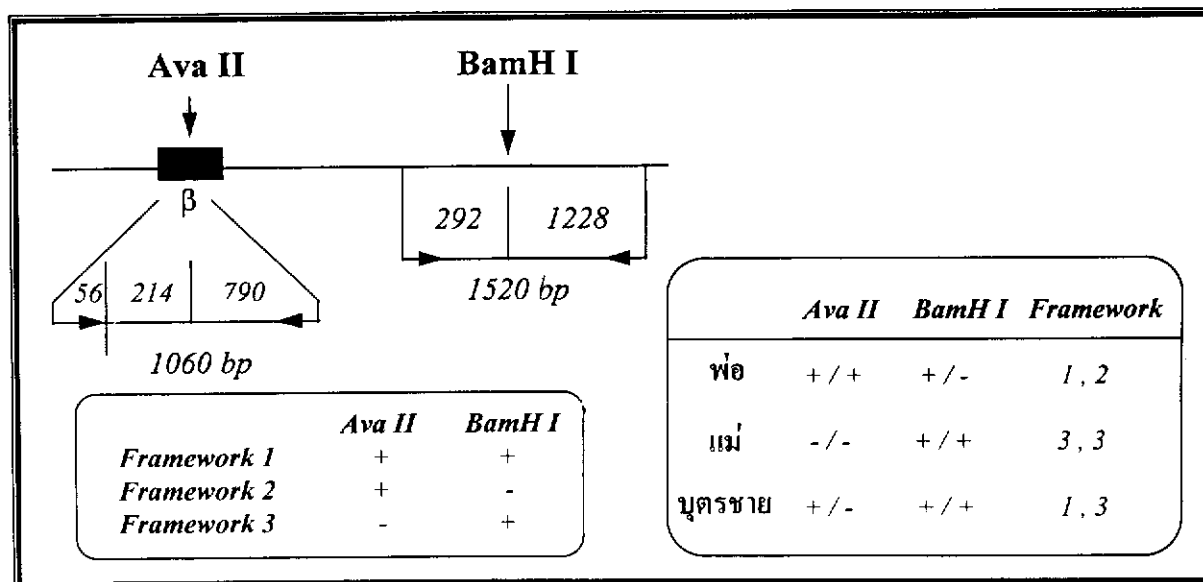


รูปที่ 2 การตรวจกรองหายีนปีตาธาลัสซีเมียในครอบครัว 1,4,7 และ 10 เป็น positive control ของแต่ละมิวเตชัน 2,5,8,11 เป็นดีเอ็นเอแม่ 3,6,9,12 เป็นดีเอ็นเอของพ่อ ตรวจพบว่าแม่เป็นพาหะของยีน IVS 1#5 G-C

3. การตรวจวิเคราะห์เฟรมเวอร์คของยีนปีตาโลบิน

รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของ *Ava II* และ *BamH I* polymorphism ในบริเวณยีนปีตาโลบินและตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ และการกำหนดชนิดของเฟรมเวอร์คของยีนปีตาโลบินซึ่งอาศัยรูปแบบของ *Ava II* และ *BamH I* polymorphisms ที่ตรวจพบ โดยกำหนดให้เฟรมเวอร์ค 1, 2 และ 3 มีรูปแบบของโพลิมอร์ฟิสมเป็น (*Ava II* +, *BamH I* +), (*Ava II* +, *BamH I* -) และ (*Ava II* -, *BamH I* +) ตามลำดับ โดยเครื่องหมาย + และ - หมายถึงมีและไม่มี polymorphic site นั้นๆ ตามลำดับจากการตรวจโพลิมอร์ฟิสมนี้ในพ่อแม่และบุตรชาย

และการจำแนกตามหลักพันธุกรรม ทำให้สามารถกำหนดได้ว่ายีนปีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C ในแม่สัมพันธ์กับยีนปีตาโลบินชนิดเฟรมเวอร์ค 3 (*Ava II* -, *BamH I* +) ส่วนยีนปีตาธาลัสซีเมียในพ่อที่ไม่ทราบชนิดของความผิดปกตินั้นสัมพันธ์กับปีตาโลบินชนิดเฟรมเวอร์ค 1 (*Ava II* +, *BamH I* +) โดยมียีนปีตาโลบินปกติสัมพันธ์กับยีนปีตาโลบินชนิดเฟรมเวอร์ค 2 (*Ava II* +, *BamH I* -) การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในครอบครัวนี้จึงสามารถทำได้แน่นอนโดยการตรวจหาเฟรมเวอร์คของยีนปีตาโลบินของการกร่วมกับการตรวจหายีน IVS1# 5G-C โดยตรง

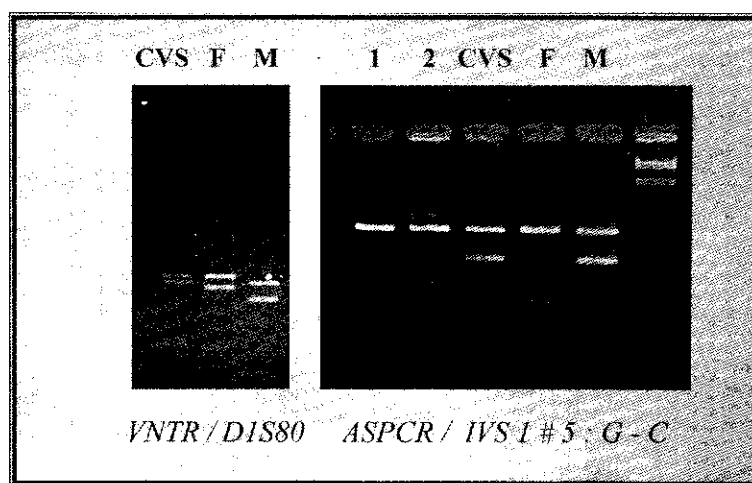


รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของ Ava II และ BamH I polymorphisms บริเวณยีนบีตาโกลบิน การกำหนด framework ของยีน และการตรวจด้วยวิธี PCR ผลการตรวจของ พ่อ แม่ และ บุตรชาย แสดงไว้ในกรอบด้านขวามือ

4. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทารก

ตัวอย่างทารกในครรภ์เป็นชิ้นเนื้อรก (chorionic villi sample, CVS) ที่เจาะเก็บโดยอาศัยการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเครื่องชี้นำ¹⁵ เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจหายีนบีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C ร่วมกับการตรวจ VNTR locus D1S80 ตรวจพบความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ แม่ ลูกชัดเจนและไม่พบดีเอ็นเอแม่ปนในทารก โดยตรวจพบยีนบีตาธาลัสซีเมียชนิด

IVS1#5 G-C ในทารกด้วย (รูปที่ 4) ผลการตรวจ Ava II และ BamH I polymorphisms ของ CVS พบว่าเป็นชนิด (+/-) และ (+/+) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์แบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแล้วพบว่าทารกในครรภ์มียีนบีตาโกลบินเป็นชนิดเฟรมเวอร์ค 1 และ 3 ร่วมกัน การตรวจทั้งหมดนี้ให้ผลเหมือนกับการตรวจตัวอย่างเลือดทารกในครรภ์ที่ส่งตรวจยืนยันในภายหลังด้วย



รูปที่ 4 ผลการตรวจ CVS ดีเอ็นเอ ของ locus D1S80 เทียบกับพ่อ (F) และแม่ (M) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามี correct paternity และไม่มี maternal DNA contamination (ซ้าย) และตรวจพบยีนบีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C ใน CVS ด้วย (ขวา)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ขั้นตอนสำคัญของการดำเนินงานเพื่อการควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยประกอบด้วย การตรวจกรองเพื่อค้นหาผู้ที่เป็นพาหะ (carrier screening), การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (genetic counselling) และการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์มารดาที่เสี่ยง (pre-natal diagnosis) โดยมุ่งการดำเนินงานไปที่โรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 3 ชนิดคือ โฮโมไซกัสอัลฟาคุนยธาลัสซีเมียซึ่งทำให้เกิดโรค Hb Bart's hydrops fetalis, บีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี และบีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์หรือโฮโมไซกัสบีตาธาลัสซีเมีย³ ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ของโรคธาลัสซีเมียทั้งสามชนิดนี้มุ่งไปที่การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้เร็วขึ้นในระยะแรกๆ ของการตั้งครรภ์ การตรวจยีนธาลัสซีเมียเหล่านี้โดยวิธีพีซีอาร์จึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น

การตรวจหา ยีนอัลฟาคุนยธาลัสซีเมียและยีนฮีโมโกลบินอีทำได้ไม่ยากนักด้วยวิธีอัลลีสเปซิฟิกพีซีอาร์ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ได้โดยการตรวจเนื้อรกหรือเซลล์น้ำคร่ำ^{12,16,17} แต่การตรวจหา ยีนบีตาธาลัสซีเมียนั้นสำหรับคนไทยซึ่งมียีนธาลัสซีเมียที่ตรวจพบแล้วหลายชนิดและมีบางชนิดที่ยังไม่ทราบรูปแบบของความผิดปกติ การตรวจหา ยีนเหล่านี้ในผู้ที่เป็พาหะจึงอาจยุ่งยากอยู่บ้างหากต้องตรวจหา ยีนเหล่านี้ทั้งหมดก็จะใช้เวลานานและเสียค่าใช้จ่ายมาก แม้จะสามารถเลือกตรวจได้ตามความถี่ที่ตรวจพบในแต่ละภูมิภาคของประเทศก็ตาม^{5,6} หลายแห่งได้ใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization¹⁸ มาช่วยในการตรวจซึ่งทำให้สามารถตรวจหา ยีนบีตาธาลัสซีเมียได้หลายชนิดพร้อมกัน แต่ก็ต้องมีขั้นตอนการทำภายหลังจากขั้นตอนของพีซีอาร์แล้วอีกมาก และใช้ตรวจหา ยีนบีตาธาลัสซีเมียที่ทราบชนิดของความผิดปกติแล้วเท่านั้น หากยังไม่ทราบชนิดของ

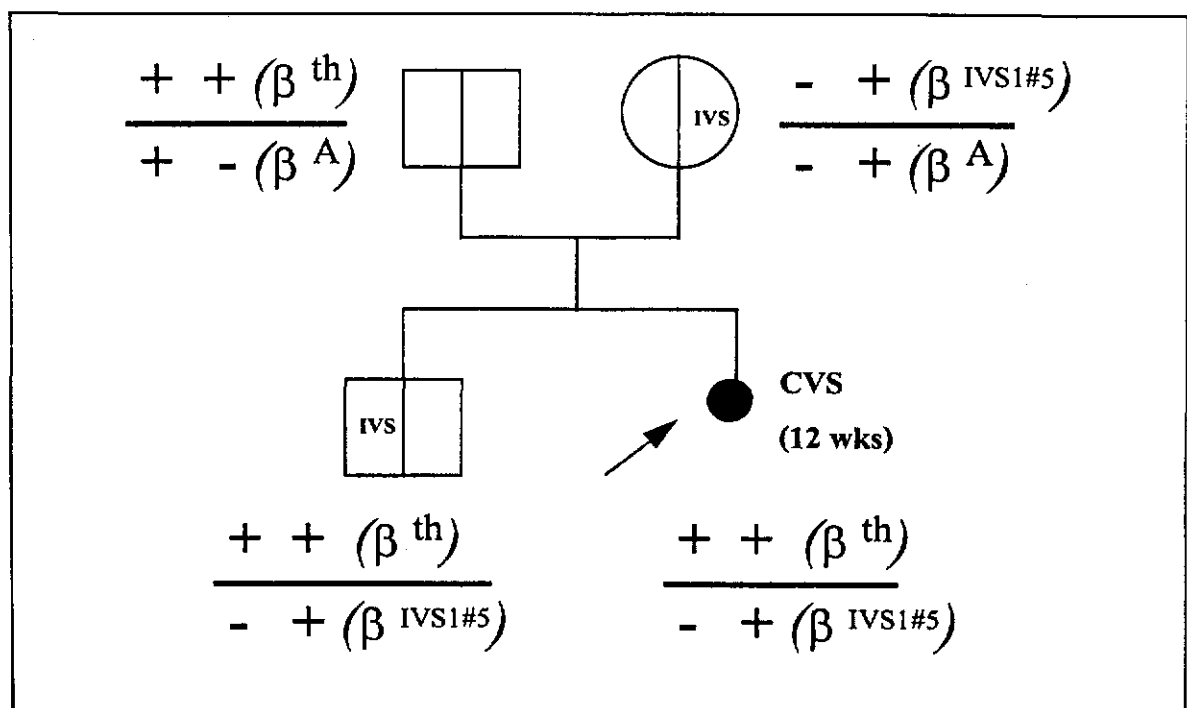
ยีนเดชนก็จะทำไม่ได้

การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคอัลลีสเปซิฟิกพีซีอาร์ที่ใช้ในการตรวจหา ยีนบีตาธาลัสซีเมียโดยตรง (direct analysis) และการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์ฟิสมของยีนบีตาโกลบินที่ใช้ในการกำหนดเฟรมเวอร์คและตรวจความสัมพันธ์ของโพลีเมอร์ฟิสมกับยีนบีตาโกลบิน (indirect linkage analysis) ร่วมกับการวิเคราะห์พงสาวลีในครอบครัวผู้ป่วย (pedigree analysis) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคบีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ในครอบครัวหนึ่ง ซึ่งเกิดจากยีนบีตาธาลัสซีเมียที่ต่างกัน 2 ชนิด ชนิดแรกที่พบในแม่เกิดจากมิวเตชันชนิด IVS1#5 G-C ซึ่งพบได้บ่อยในคนไทย (common mutation) และตรวจได้ไม่ยากด้วยเทคนิคอัลลีสเปซิฟิกพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 2 (12) แต่ยีนบีตาธาลัสซีเมียอีกชนิดหนึ่งที่พบในพ่อ นั้นตรวจไม่พบด้วยเทคนิคอัลลีสเปซิฟิกพีซีอาร์ที่ใช้ในงานประจำวัน จึงอาจเป็นชนิดที่พบไม่บ่อย (rare mutation) หรือเป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน (uncharacterized mutation) จึงไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคการตรวจยีนธาลัสซีเมียที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเว้นแต่จะตรวจหาลำดับเบสของยีนโดยตรงโดยการทำให้ DNA sequencing ซึ่งมีขั้นตอนการตรวจที่ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจนานกว่า จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ต้องการผลการตรวจค่อนข้างเร็ว เพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจและให้คำปรึกษาแนะนำแก่ครอบครัวผู้ป่วย

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการตรวจดีเอ็นเอโพลีเมอร์ฟิสมในกลุ่มยีนบีตาโกลบินบางชนิดที่ใช้ในการกำหนดเฟรมเวอร์คของยีนบีตาโกลบินเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ง่ายกว่าและให้ผลเร็วกว่า ดังแสดงในรูปที่ 3 ยีนบีตาโกลบินของคนแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดหรือ 3 เฟรมเวอร์คคือ เฟรมเวอร์ค 1 (Ava II + BamH I +),

เฟรมเวอร์ค 2 (Ava II + BamH I -) และเฟรมเวอร์ค 3 (Ava II - BamH I +) การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์ฟิสมของครอบครัวนี้ในพ่อและแม่และศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดโพลีเมอร์ฟิสมไปยังบุตรชายคนแรกที่เป็นโรคปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ ทำให้ทราบว่ายีนปีตาธาลัสซีเมียในพ่อที่ถ่ายทอดไปยังบุตรชายนั้นสัมพันธ์ (linked) กับเฟรมเวอร์ค 1 และยีนปกติของพ่อสัมพันธ์กับเฟรมเวอร์ค 2 โดยมีแม่เป็นโฮโมไซกัสของเฟรมเวอร์ค 3 ที่ข้างหนึ่งเป็นยีนปีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS1#5 G-C ดังนั้นการตรวจหายีนชนิด IVS1#5 G-C โดยตรงร่วมกับการตรวจหาชนิดของยีนปีตาธาลัสซีเมียเฟรมเวอร์ค ของทารกจะสามารถให้การวินิจฉัยทารกได้ (รูปที่ 4) ซึ่งผลการตรวจพบว่ายีนปีตาธาลัสซีเมียของทารกเป็นชนิดเฟรมเวอร์ค 1 และเฟรมเวอร์ค 3 และตรวจพบยีน IVS1#5 G-C ซึ่งสัมพันธ์กับเฟรมเวอร์ค 3 ในแม่ด้วย แสดงว่าทารกในครรภ์ได้รับยีนปีตาธาลัส-

ซีเมียอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ทราบชนิดของความผิดปกติและสัมพันธ์กับเฟรมเวอร์ค 1 ในพ่อมาด้วย จึงสรุปได้ว่าทารกในครรภ์เป็นโฮโมไซกัสปีตาธาลัสซีเมียเหมือนบุตรชายคนแรก (รูปที่ 5) และเหมือนกับผลการตรวจเลือดทารกซึ่งส่งตรวจยืนยันในภายหลัง จะเห็นได้ว่าการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวนี้ทำได้โดยไม่จำเป็นต้องทราบชนิดของความผิดปกติของยีนปีตาธาลัสซีเมียในพ่อเลย อย่างไรก็ตามต้องแน่ใจในความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อ แม่และทารกด้วยจึงจะให้การวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง การตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดนี้อาจทำได้ด้วยการตรวจ VNTR polymorphism ในพ่อ แม่และลูกซึ่งในการศึกษาค้างนี้ได้เลือกใช้ VNTR locus D1S80¹⁴ ซึ่งนอกจากจะบอกความสัมพันธ์ทางสายเลือดในครอบครัวแล้วยังใช้ตรวจดูการปนเปื้อนของดีเอ็นเอแม่ในทารกได้ด้วย (รูปที่ 4)



รูปที่ 5 สรุปผลการตรวจหา framework ของยีนปีตาธาลัสซีเมียในครอบครัวผู้ป่วยและแบบแผนการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ จากการศึกษาสรุปได้ว่าทารกในครรภ์เป็นโรคปีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ โดยได้รับยีนปีตาธาลัสซีเมียที่ไม่ทราบชนิด (β^{th}) จากพ่อและยีนปีตาธาลัสซีเมียชนิด IVS 1#5 G-C ($\beta^{IVS1\#5}$) จากแม่

ตัวอย่างการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสำหรับครอบครัวผู้ป่วยที่สามารถตรวจดีเอ็นเอของสมาชิกในครอบครัวได้อย่างครบถ้วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลูกที่เป็นโรคหรือหากไม่เคยมีลูกเป็นโรคมามาก่อน แต่สามารถตรวจย้อนกลับไปถึงรุ่นปู่ย่า ตายายได้ วิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นทางเลือกของการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ดีทางหนึ่งที่เหมาะสม เนื่องจากการตรวจด้วยเทคนิคอัลลีลสเปคิฟิกพีซีอาร์และการตรวจดีเอ็นเอโพลีเมอร์เฟสซึ่งสามารถทำได้ด้วยวิธีพีซีอาร์และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นการตรวจดีเอ็นเอพื้นฐานที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอทั่วๆ ไปและใช้เวลาในการตรวจไม่นานและจากประสบการณ์การให้บริการการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคบีตาธาลัสซีเมียในคนไทย ส่วนใหญ่มักทำในครอบครัวที่เคยมีลูกเป็นโรคมามาก่อน (retrospective cases)¹⁹ เชื่อว่าวิธีการและแนวทางที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะมีประโยชน์ต่อการดำเนินงานตามแผนงานการควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียของไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ใช้ทุนสนับสนุนบางส่วนจากสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและบางส่วนจากทุนอุดหนุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. 3rd ed, Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1981.
2. Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravatmuang P, Fucharoen S. Thalassemia in Thailand. Ann NY Acad Sci USA 1980; 344: 352-63.
3. วิจารย์ พานิช. การควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย. ใน: สุรพล อิศโรกรศีล (บก) โลหิตวิทยา: การประชุมวิชาการประจำปีสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5 เรื่อง การวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วยทางโลหิตวิทยาที่พบบ่อยในประเทศไทย, 28 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2534.
4. Cao A, Rosatelli MC. Screening and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Bailliere's Clin Haematol 1993; 6: 263-86.
5. Fucharoen Sp, Fucharoen G, Sriroongreung W, et al. Molecular basis of β -thalassemia in Thailand: analysis of β -globin gene mutations using the polymerase chain reaction. Hum Genet 1989; 84: 41-6.
6. Fucharoen G, Fucharoen Sp, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. Molecular basis of HbE- β -thalassemia and the origin of HbE in northeast Thailand: identification of one novel mutation using amplified DNA from buffy coat specimen. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170: 698-704.
7. สุพรรณ พุเจริญ, กุลนภา พุเจริญ. พื้นฐานโมเลกุลของเบต้าธาลัสซีเมียในประเทศไทย. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2534; 19: 7-16.
8. Fucharoen Sp, Fucharoen G, Laosombat V, Fukumaki Y. Double heterozygosity of the β -Malay and a novel β -thalassemia gene in a Thai patient. Am J Hematol 1991; 38: 142-4.
9. Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, et al. Linkage of β -thalassemia mutations and β -globin polymorphisms

- with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature* 1982; 296: 627-31.
10. สุพรรณ ฟุเจริญ, กุลนภา ฟุเจริญ. ธาลัสซีเมียและพาหะ: การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. การประชุมวิชาการกลางปีสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย. *Current Practice in Hematology* 1997; 76-93.
 11. Fukumaki Y, Fucharoen Sp, Fucharoen G, *et al.* Molecular heterogeneity of β -thalassemia in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1992; 23: 14-21.
 12. Fucharoen Sp, Fucharoen G, Jetsrisuparb A, Ratanasiri T, Fukumaki Y. Molecular analysis of globin genes: application to prenatal diagnosis. *Advance Biochem Mol Biol (IUBMB Symposium)* 1995; 239: 27-34.
 13. Fukumaki Y, Fucharoen Sp. Generation and spread of b-globin gene mutations in populations: β -thalassemia in Asia countries. In: Kimura M, Takahata N (eds) *New Aspect of Genetics and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin 1991; 38: 153-76.
 14. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 137-44.
 15. ถวัลย์วงศ์ รัตนสิริ. การวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย: เทคนิคทางสูติศาสตร์. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2538; 7: 71-9.
 16. Fucharoen G, Fucharoen Sp. Rapid and simultaneous non radioactive method for detecting α -thalassemia 1 (SEA type) and Hb Constant Spring genes. *Eur J Hematol* 1994; 53: 186-7.
 17. Fucharoen Sp, Fucharoen G, Ratanasiri T, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. A simple non radioactive assay for hemoglobin E gene in prenatal diagnosis. *Clin Chim Acta* 1994; 229: 197-203.
 18. Sutcharitchan P, Saiki RK, Erlich HA, Winichagoon P, Fucharoen S, Embury SH. Reverse dot blot detection of Thai β -thalassemia mutations. *Blood* 1995; 90: 809-16.
 19. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, *et al.* Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: experience from 100 pregnancies. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1991; 22: 16-29.