LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
2 AUG 1995

PRENATAL AND POSTNATAL DIAGNOSIS OF THALASSEMIA IN THAILAND

ขาด
"มหิดลวิทยานุสรณ์ ๒๕๑๗"

PETCHARA TUSSANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1995

TH
FAC4p
1995

32834

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียในทารกในครรภ์ และหลังคลอดในประเทศไทย

ผู้วิจัย ร.อ.หญิง เพชรา ทัศนา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สมทรง เลขะกุล วท.ม., M.Sc.
สุทัศน์ ฟู่เจริญ พ.บ.
ปราณี ฟู่เจริญ ปร.ด.
สุจินต์ กนกพงศ์ศักดิ์ พ.บ.

วันที่สำเร็จการศึกษา 26 เมษายน พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคซีดทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง ซึ่งมีอุบัติการสูงมากในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 20-30 ของประชากร มียีน α-thalassemia ร้อยละ 3-9 มียีน β-thalassemia และพบยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติ 2 ชนิดคือ ฮีโมโกลบิน E (Hb E) และฮีโมโกลบิน Constant Spring (Hb CS)

ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงที่สังเคราะห์สายโกลบินลดลง หรือสังเคราะห์ไม่ได้เลย โดยที่โครงสร้างหรือกรดอะมิโนของสายโกลบินยังคงปกติ สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด α-thalassemia คือ การที่ยีนโกลบินชนิด α ขาดหายไป (deletion) ความรุนแรงที่เกิดจะขึ้น

Copyright by Mahidol University

อยู่กับจำนวนยีน α ที่ขาดหายไป ถ้าโครโมโซมคู่หนึ่งมียีน α บนโครโมโซมข้างหนึ่งขาดหายไปทั้งสองยีน ($--/\alpha\alpha$) จะเกิดเป็น α-thalassemia 1 หรือ α°-thalassemia trait ซึ่งไม่มีการสร้างสายโกลบิน α จากโครโมโซมข้างนั้นเลย ถ้ายีน α บนโครโมโซมข้างหนึ่งขาดหายไปเพียงยีนเดียว ($-\alpha/\alpha\alpha$) เรียกว่า α-thalassemia 2 หรือ α^{+}-thalassemia trait จะมีการสร้างสายโกลบิน α ได้บ้าง จึงมีความรุนแรงน้อยกว่า α-thalassemia 1, homozygote ของ α-thalassemia 1($--/--$) จะไม่มีการสร้างสายโกลบิน α เลย ทำให้เกิดโรค Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุด ทารกจะตายหมดตั้งแต่คลอด หรือภายในไม่กี่ชั่วโมงหลังคลอด compound heterozygote ของ α-thalassemia 1 และ α-thalassemia 2 ($--/-\alpha$) จะทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียที่เรียกว่า Hb H disease

β-thalassemia มีการสร้างโกลบิน β น้อยลงหรือสร้างไม่ได้เลยความผิดปกติส่วนใหญ่จะเกิดจากการที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไป (base substitution) หรือเบสจำนวนน้อยๆ ขาดหายไปหรือเกินมา (small deletion หรือ insertion) ทำให้เกิดมิวเตชั่นชนิดที่เรียกว่า frameshift mutation ความรุนแรงของ β-thalassemia ขึ้นอยู่กับชนิดของมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นว่าจะยังคงสร้าง mRNA หรือ β-globin ได้หรือไม่ ถ้าไม่มีการสร้างสายโกลบิน β เลย เรียกว่า β°-thalassemia และถ้ามีการสร้าง β-globin ได้บ้าง เรียกว่า β^{+}-thalassemia ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน β° กับ β°, β° กับ β^{+} หรือ β^{+} กับ β^{+}-thalassemia ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย ที่มีอาการรุนแรงได้มากน้อยแตกต่างกัน

Copyright by Mahidol University

ส่วน Hb E และ Hb CS นอกจากจะเป็นโกลบินที่มีโครงสร้างผิดปกติแล้ว ปริมาณที่ถูกสร้างขึ้นลดลงด้วย จึงมีผลเหมือนกับ β^+-thalassemia และ α- thalassemia 2 ตามลำดับ และเนื่องจาก Hb E อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับยีน β-thalassemia และยีน Hb CS อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับยีน α-thalassemia ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง Hb E กับ β-thalassemia ทำให้เกิดโรค β-thalassemia/Hb E และระหว่าง Hb CS กับ α-thalassemia 1 ทำให้เกิดโรค Hb H-CS ได้

การป้องกันมิให้มีผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียเกิดขึ้นใหม่ประกอบด้วยการตรวจกรองหา heterozygote การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (genetic counseling) และการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ (prenatal diagnosis) โดยการคัดเลือกลูกด้วยการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในคู่สมรสที่เป็น heterozygote ทั้งคู่ ซึ่งทารกในครรภ์ อาจจะปกติหรือเป็น heterozygote หรือเป็นโรคธาลัสซีเมียก็ได้ แล้วเลือกทำแท้งเฉพาะทารกที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคธาลัสซีเมีย ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีวัดปริมาณของ Hb A_2 และ Hb F โดยวิธี ELISA เพื่อวินิจฉัยพาหะของ β-thalassemia พบว่าจากตัวอย่างเลือด β-thalassemia trait จำนวน 30 ราย วัดปริมาณ Hb A2 โดยวิธี ELISA ได้ 5.5 $\pm$0.88 % และ Hb F ได้ 2.2 $\pm$0.7% และ ปริมาณ Hb A_2 ที่วัดได้โดยวิธีนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณของ Hb A_2 ที่วัดโดยวิธี CAE (cellulose acetate electrophoresis) วิธีการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ทำโดยการเก็บตัวอย่างเลือด หรือเซลล์ของทารกในครรภ์นำไปตรวจหาความผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำได้หลายวิธีแล้วแต่ชนิดของโรคธาลัสซีเมีย และอายุครรภ์ของมารดา

งานวิจัยนี้เป็นการประยุกต์วิธีพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เพื่อใช้ตรวจความผิดปกติของอณูดีเอ็นเอ เพื่อหายีนของธาลัสซีเมียสามารถทำได้ตั้งแต่ไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ (8-10 สัปดาห์) โดยสูติแพทย์เก็บเนื้อเยื่อ chorion (chorionic villus sampling) หรือเนื้อ

Copyright by Mahidol University

เยื่อ fibroblast จาก amniotic fluid (amniocentesis) เมื่ออายุครรภ์ประมาณ 11-16 สัปดาห์ หรือเก็บ buffy coat จากเลือดสายสะดือของทารกเมื่ออายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ก็ได้ ในงานวิจัยนี้ได้เพิ่มจำนวนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 300-1500 เบส แล้วนำ DNA ที่เพิ่มจำนวนไปทำการตรวจสอบความผิดปกติของยีนโดยการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับการผ่าเหล่าแต่ละชนิดโดยวิธีการทำไฮบริไดเซชั่น จากการศึกษายีนเบต้า-ธาลัสซีเมียจำนวน 35 ยีน จากพ่อแม่ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี 23 คู่ และโรคโฮโมซัยกัสเบต้า-ธาลัสซีเมีย 5 คู่ พบว่ามีการผ่าเหล่า 3 ชนิด ได้แก่ (1) การขาดหายของนิวคลีโอไทด์ 4 ตัว ที่รหัสสำหรับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 41/42 (2) การเกิดรหัสหยุดสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ 17 (3) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 5 ของดีเอ็นเอ ที่แทรกระหว่างเนื้อยีนส่วนที่ 1 กับส่วนที่ 2 (IVS 1) ความชุกชุมของการผ่าเหล่าทั้ง 3 ชนิด พบได้ในสัดส่วนร้อยละ 36, 28 และ 16 โดยลำดับในผู้ป่วยกลุ่มแรก และ 30, 10, 20 ในผู้ป่วยกลุ่มหลัง นอกจากนี้ยังมีการผ่าเหล่าอันเนื่องจากการแทรกเพิ่มของนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว ระหว่างรหัสสำหรับกรดอะมิโนตัวที่ 71 และ 72 และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 654 ในดีเอ็นเอที่แทรกระหว่างเนื้อยีน เบต้า-โกลบินส่วนที่ 2 กับส่วนที่ 3 (IVS 2) และอีกประมาณร้อยละ 12-20 ของยีนเบต้า ยังไม่ทราบชนิดของการผ่าเหล่า ซึ่งจำเป็นจะต้องทำการวิเคราะห์ต่อไป การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์จำนวน 33 รายที่เสี่ยงต่อโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี และ 10 รายที่เสี่ยงต่อโรคโฮโมซัยกัส เบต้า-ธาลัสซีเมีย พบทารกในครรภ์ที่เป็นโรครวม 7 ราย สำหรับการตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าด้วยการทำไฮบริไดเซชั่นจากตัวอย่างเลือดสายสะดือได้กระทำควบคู่ไปกับวิธีสังเคราะห์โปรตีนโกลบินในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและพบว่าให้ผลที่แม่นยำเช่นเดียวกัน

Copyright by Mahidol University

การตรวจความผิดปกติของยีนจากอณูดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธีพีซีอาร์ อาจทำได้โดยวิธีอิเลคโตรโฟร์ซิสบนวุ้น ซึ่งได้นำวิธีการนี้มาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยก่อนกำเนิดทารกในครรภ์จำนวน 14 คน ซึ่งเสี่ยงต่อการเป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด Hb Bart's hydrops fetalis หรือโรคโฮโมซัยกัสแอลฟา-ธาลัสซีเมีย ซึ่งในจำนวนนี้ 2 ราย ได้รับการวินิจฉัยเป็น Hb Bart's hydrops fetalis

โดยสรุปวิธีพีซีอาร์เป็นวิธีง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีศักยภาพสูง การศึกษาถึงระดับอณูดีเอ็นเอช่วยให้การตรวจวิเคราะห์ยีนแอลฟา และเบต้าโกลบิน และการตรวจวินิจฉัยก่อนกำเนิดโรคธาลัสซีเมียเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และแม่นยำ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Prenatal and Postnatal Diagnosis of Thalassemia in Thailand

Name Petchara Tussana

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Somsong Lekkakula, M.S., M.Sc.
Suthat Fucharoen, M.D.
Pranee Fucharoen, Ph.D.
Sujin Kanokpongsakdi, M.D.

Date of Graduation 26 April B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Hemoglobinopathics are the most common genetic disorders in Thailand with α-thalassemia, β-thalassemia, hemoglobin (Hb)E and Hb Constant Spring (CS) being prevalent. The molecular defects of thalassemias are heterogeneous α-thalassemia in Thailand is most often due to gene deletion. The severe form of α-Thalassemia, α-thalassemia 1, involves a deletion of the duplicated α-globin genes whereas the milder form, α-thalassemia 2, has one α-globin gene left functioning on the chromosome. Hb CS is a variant with elongated α-globin chain due to mutation at the termination codon of the α_2-globin gene, however its mRNA is unstable and thus only small amounts of Hb CS are produced, resulting in an α-thalassemia 2-like effect. In constrast the majority of molecular

Copyright by Mahidol University

defects in β-thalassemia resulted from point mutations and small deletions or insertions of nucleotides in the β-globin gene.

The two major α-thalassemia disease are Hb Bart's hydrops fetalis (homozygous α-thalassemia 1) and Hb H disease (α-thalassemia 1/α-thalassemia 2 or α-thalassemia 1/Hb CS). Homozygous β-thalassemia and β-thalassemia /Hb E are major β-thalassemic syndromes in Thailand.

Since hemoglobinopathies are prevalent in Thailand. Genetic counseling, detection of the high risk couples and prenatal diagnosis should be performed to prevent and control of the severe thalassemic diseases. In this study detection of β-thalassemia heterozygote was examined by the ELISA technique. Quantitation of Hb A_2 and Hb F was performed in 30 cases of β-thalassemia heterozygote and the percentage of Hb A_2 was found to be 5.5±0.88% and Hb F was 2.2 ±0.7%. The results were correlated with those from cellulose acetate electrophoresis(CAE) and elution.

Identification of molecular defects causing thalassemia in a particular geographic area is essential so that a prenatal diagnosis program based on the use of DNA analysis can be implemented.

The PCR technique has been applied to investigate the molecular defect causing thalassemia in Thai population in this study. It was used in combination with a direct detection of the amplified DNA product on gel electrophoresis and with non-radioactively labeled ASO-probe hybridization. A total of 35 β-thalassemic genes from 23 couples at risk of having fetuses with β-thalassemia/hemoglobin E disease and 5 couples risk for homozygous β-thalassemic disease were analysed. Three common mutations observed were 4-bp deletion at codon 41/42, nonsense mutation at codon 17, nucleotide substitution at the position 5 of IVS 1 of the β-globin gene. Their frequencies were found to be 36 %, 28 % and 16 % in the first group of patients and were 30%, 10%, 12% in the latter, respectively. Other mutations including frameshift mutation at codons 71/72,

Copyright by Mahidol University

nucleotide substitution at the position 654 of IVS 2 were also detected at a low frequency. About 12-20% of the β-thalassemia genes were unknown which need to be further analysed.

The PCR technique in combination with the simple and direct detection methods of the amplified DNA product by gel electrophoresis was also applied for prenatal diagnosis of 33 fetuses at risk of having either β-thalassemic/Hb E or having homozygous β-thalassemic diseases seven were found to be affected. In the fetuses that the diagnoses were unsuccessful by DNA analysis because of the unknown mutations, the diagnosis was subsequently performed by the conventional *in vitro* globin chain synthesis. In 14 fetuses at risk of having homozygous α-thalassemia 1 the diagnoses could successfully be made in all of 14 fetuses and in 2 out of 14 fetuses were Hb Bart's hydrop fetalis by PCR and hemoglobin electrophoresis after postnatal. The diagnosis of the affected fetuses by the PCR and gel-electrophoresis technique and by Hb electrophoresis were in good agreement. In conclusion, the PCR technique is simple, fast, and powerful, which provides a great help for gene analysis and for prenatal detection of the thalassemic diseases in the country.

Copyright by Mahidol University