LIBRARY AND MEDICAL SCIENCE CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

4 AUG 1995

CHANGES IN HEMATOLOGIC PARAMETERS AMONG DIFFERENT TYPES OF BETA-THALASSEMIA MUTATION

THANUSAK TATU

2

จาก

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
T3H3 C
1995

Copyright by Mahidol University

32914

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาในโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย ที่มีความผิดปรกติระดับยีนต่าง ๆ กัน

ผู้วิจัย ธนูศักดิ์ ตาตุ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

รัชนีกร กัลล์ประวิทย์, ปร.ด.
สุทัศน์ พู่เจริญ, พ.บ.
พงษ์จันทร์ หัตถีรัตน์, พ.บ.
ปราณี พู่เจริญ, ปร.ด.

วันที่สำเร็จการศึกษา 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

เบต้า-ธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปรกติของการสังเคราะห์โปรตีนเบต้า-โกลบิน ก่อให้เกิดอาการซีด เหลือง ตับม้ามโต และเป็นที่ทราบกันดีว่าอาการของกลุ่มเบต้า-ธาลัสซีเมียมีความแปรปรวนมาก กลุ่มที่มีอาการน้อยจะไม่ซีดมาก ตับม้ามโตเล็กน้อย ส่วนกลุ่มที่มีอาการมากจะซีดมาก มีตับโต ม้ามโต ร่างกายแคระแกรน ใบหน้าเปลี่ยนแปลงแบบ"หน้าธาลัสซีเมีย" ต้องได้รับเลือดตลอดเวลา ปัจจุบันพบว่าความผิดปรกติของยีนเบต้า-โกลบินมีผลต่อความแปรปรวนของอาการดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของความผิดปรกติของยีนเบต้า-โกลบินต่อลักษณะการแสดงออกของค่าทางโลหิตวิทยา ซึ่งถือว่าเป็นอาการแสดงออกชนิดหนึ่ง โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มคือ

Copyright by Mahidol University

1. กลุ่มพาหะโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย ซึ่งมีความผิดปรกติของยีนต่าง ๆ กัน ประกอบด้วย
   1.1 การขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 4 ตัวที่รหัสสำหรับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 41/42
   1.2 การเกิดรหัสหยุดสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ 17
   1.3 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งที่ 5 ในดีเอ็นเอที่แทรกระหว่างเนื้อยีนเบต้า-โกลบินส่วนที่ 1 (IVS-1)
   1.4 การเกิดรหัสหยุดสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ 35
   1.5 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งที่ 654 ในดีเอ็นเอที่แทรกระหว่างเนื้อยีนเบต้า-โกลบินส่วนที่ 2 (IVS-2)
   1.6 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนควบคุมการทำงานของยีนที่ตำแหน่ง -28
2. กลุ่มโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบิน อี ซึ่งข้างหนึ่งของโครโมโซมมีความผิดปรกติของยีนต่าง ๆ ประกอบด้วย
   2.1 การขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 4 ตัวที่รหัสสำหรับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 41/42
   2.2 การแสดงรหัสหยุดสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ 17
   2.3 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5 ในดีเอ็นเอที่แทรกระหว่างเนื้อยีนเบต้า-โกลบินตำแหน่งที่ 1 (IVS-1)
   2.4 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 654 ในดีเอ็นเอที่แทรกระหว่างเนื้อยีนเบต้า-โกลบินตำแหน่งที่ 2 (IVS-2)
   2.5 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนควบคุมของการทำงานของยีนที่ตำแหน่ง -28

โดยการเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาต่าง ๆ ดังนี้ RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, HbA_2, HbF ในกลุ่มแรกพบว่า ค่า RBC, Hb, Hct, MCHC, HbA_2, Hb F ของความผิดปรกติทุกชนิดไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า P-value ตามลำดับดังนี้ 0.08, 0.31, 0.24, 0.14, 0.11, 0.17

Copyright by Mahidol University

ส่วนค่า MCV, MCH บ่งบอกถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า P-value 0.03, 0.005 และความผิดปรกติชนิดที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนควบคุมการทำงานของยีนที่ตำแหน่ง -28 มีแนวโน้มที่มีค่า MCV, MCH สูงกว่ากลุ่มที่เหลือ

ในกลุ่มที่สอง การเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาประกอบด้วย RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, Hb E, Hb F พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่าเหล่านี้ในกลุ่มความผิดปรกติของยีนที่ทำการศึกษา โดยมีค่า P-value ตามลำดับดังนี้ 0.46, 0.23, 0.22, 0.53, 0.61, 0.57, 0.63, 0.06 และความผิดปรกติชนิดที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนควบคุมการทำงานของยีนที่ตำแหน่ง -28 มีแนวโน้มที่มีค่าต่าง ๆ เหล่านี้ดีกว่ากลุ่มที่เหลือเช่นเดียวกัน

เนื่องจากปัจจุบันวิธีการเพิ่มสายดีเอ็นเอสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยวิธีการที่เรียกว่าโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น ทำให้สามารถใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย เพื่อการศึกษาระดับโมเลกุล การหยดเลือดลงบนกระดาษกรองเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถจะใช้เป็นวิธีการเก็บสารตัวอย่างเพื่อส่งตรวจโดยเฉพาะในการวิจัยภาคสนาม หรือส่งสารตัวอย่างมาจากดินแดนห่างไกล การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการค้นหาระบบและวิธีการที่เหมาะสมสำหรับวิธีการหยดเลือดลงบนกระดาษกรองเพื่อการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย ผลการศึกษาพบว่า ปริมาตรของเลือดที่หยดลงบนกระดาษกรองที่เหมาะสมที่สุดคือ 50 ul สำหรับ WBC 5,000/cu.mm ขึ้นไป ส่น WBC ต่ำกว่า 5,000/cu.mm ควรใช้เลือดมากกว่า 50 ul ขึ้นไป นอกจากนี้พบว่ากระดาษกรองทุกชนิดสามารถใช้เป็นวัสดุค้ำจุนได้ และหยดเลือดที่หยดลงบนกระดาษกรองสามารถเก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 2 เดือน ทั้งในอุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 4°C โดยดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Changes in Hematologic Parameters among Different Types of Beta-thalassemia Mutation

Name Thanusak Tatu

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Ruchaneekorn Kalpravidh, Ph.D.

Suthat Fucharoen, M.D.

Phongjan Hathirat, M.D.

Pranee Fucharoen, Ph.D.

Date of Graduation 16 May B.E. 2538 (1995)

Abstract

Beta-thalassemia is a group of genetic disease resulting from the abnormalities of beta-globin chain synthesis ; it has been noted that there are heterogeneities of the clinical symptoms of the beta-thalassemia which ranges from mild to severe comprising marked anemia and jaundice, hepatosplenomegaly and requirement of regular blood transfusion to sustain life. The recent investigation have proved that the clinical heterogeneities are secondary to the heterogeneities of molecular defects or mutations of the beta-globin gene. We had proposed to evaluate the effect of molecular defects on the clinical symptom expressed as hematologic parameters. The subjects were divided into two groups.

Copyright by Mahidol University

1. Beta-thalassemia heterozygotes. All of them carried different types of beta-thalassemia mutation as follows :
   1.1 Four nucleotide deletion at codons 41/42 (-CTTT)
   1.2 The nucleotide substitution at codon 17 which gives rise to termination codon (A-T)
   1.3 Nucleotide substitution at IVS I-nt 5 (G-C)
   1.4 Nucleotide substitution at codon 35 which gives rise to termination codon (G-A)
   1.5 Nucleotide substitution at IVS II-nt 654 (C-T)
   1.6 Nucleotide substitution at promotor region at nt-28 to cap site (A-G)
2. Beta-thalassemia/Hb E disease. All of the subjects have the mutation leading to Hb E on one allele but have different mutations on the other which composes of
   2.1 Four nucleotide deletion at codons 41/42 (-CTTT)
   2.2 Nucleotide substitution at codon 17 which gives rise to termination codon (A-T)
   2.3 Nucleotide substitution at IVS I-nt 5 (G-C)
   2.4 Nucleotide substitution at IVS II-nt 654 (C-T)
   2.5 Nucleotide substitution at promotor region at nt-28 to cap site (A-G)

The following hematologic parameters : RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, HbA_2, Hb F in each type of mutation were compared. In the first group of subjects, there were no statistically significant difference in RBC, Hb, Hct, MCHC, HbA_2, Hb F (the P-value are 0.08, 0.31, 0.24, 0.14, 0.11 and 0.17 respectively). However, MCV and MCH showed statistically significant difference of which P-value are 0.03 and 0.005, respectively. Moreover, the

Copyright by Mahidol University

nucleotide substitution at promotor region at nt-28 to cap site had tendency to bear greater MCV and MCH than the others.

In beta-thalassemia/Hb E disease group there were no statistically significant difference of all parameters among the patients with five different mutations. The P-values were 0.46, 0.23, 0.22, 0.53, 0.61, 0.57, 0.63, 0.06 for RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Hb E and Hb F respectively. However, the promotor mutation (nucleotide substitution at nt-28 to cap site) had tendency to have better hematologic parameters than the others.

At present, DNA can be effectively amplified by the polymerase chain reaction (PCR). This technique lets the amount of sample for DNA preparation be scaled down to minute quantities. The dried blood spots on the filter paper is one of the methods to serve as the sample source, especially for field study or for removing sample from remote area. This study had proposed to search for the optimal system for the use of dried blood spots on filter paper as the sample source of DNA for molecular characterization of thalassemia syndrome via PCR technology. The results show that the optimal dot volume is 50 ul for the subject with WBC more than 5,000/cu.mm. For cases with WBC less than 5,000/cu.mm, the dot volume of more than 50 ul should be used. The types of the filter paper have no effect on the DNA yield prepared by this procedure. The dried blood spots on filter paper can be kept for at least 2 months, either at room temperature or at $4^{o}C$ and still give sufficient good human DNA yield for PCR.

Copyright by Mahidol University