บทที่ 1

บทนำ

โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemias)

โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคที่เกิดจากยีนโกลบินผิดปกติไป จนทำให้การสังเคราะห์สายโกลบินชนิดใดชนิดหนึ่งลดน้อยลง โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโกลบิน หากทำให้สายโกลบินชนิดอัลฟาลดน้อยลงจะเรียกว่าโรคอัลฟา-ธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) หากทำให้สายโกลบินชนิดเบต้าลดน้อยลง จะเรียกว่าโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) โรคธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive หมายถึงผู้ที่เป็นโรคได้ต้องมีความผิดปกติของยีนธาลัสซีเมียอย่างน้อยสองยีนหรือยีนธาลัสซีเมียที่ผิดปกติหนึ่งยีนร่วมกับยีนฮีโมโกบินที่ผิดปกติบางชนิด (gene combination) โรคอัลฟา-ธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไป (deletion) ของยีนอัลฟา-โกลบินจนมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงสร้างฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ได้น้อยจึงเกิดภาวะโลหิตจาง โดยความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันออกไปแล้วแต่จำนวนยีนที่ขาดหายไป ในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลฟา-ธาลัสซีเมียจะแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1. อัลฟา-ธาลัสซีเมีย-1 หรือ α-thal 1 (_ _/$\alpha\alpha$) เกิดจากการขาดหายไปของยีนอัลฟา-โกลบิน 2 อันที่อยู่บนโครโมโซมข้างเดียวกัน

2. อัลฟา-ธาลัสซีเมีย-2 หรือ α-thal 2 (_α/_α) เกิดจากการขาดหายไปของยีนอัลฟา-โกลบิน 1 อันบนโครโมโซมข้างหนึ่ง

โรคธาลัสซีเมียที่พบมากในประเทศไทย

เมื่อจัดเรียงตามลำดับความรุนแรงของโรคจัดได้ดังนี้

1. Hb Barts' hydrops fetalis หรือ homozygous α-thalassemia 1 มีความรุนแรงที่สุด คือ ตายหมด อายุไม่เคยถึง 24 ชม. หลังคลอด ทั้งนี้เนื่องจาก Hb Barts' เมื่อจับกับ O_2 แล้วไม่ปล่อย ทำให้เนื้อเยื่อขาด O_2

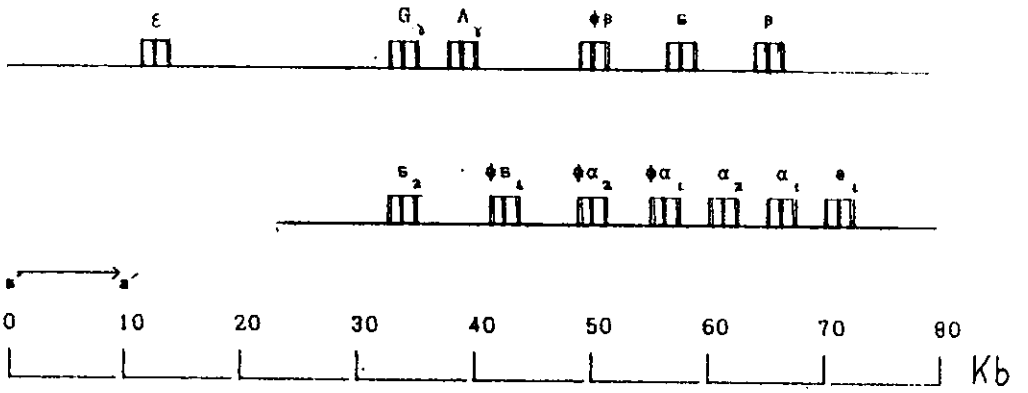
2. Thalassemia major หรือ Cooley's anemia หรือ homozygous β-thalassemia ทารกที่เป็นโรคนี้จะได้รับยีนเบต้า-ธาลัสซีเมียจากทั้งบิดาและมารดา ทำให้ฮีโมโกลบินต่ำ จะมีอาการซีดมาก เหลือง ตับม้ามโต ร่างกายเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ จมูกแบน หน้าผากสูงชัน (เรียก thalassemia face) กระดูกบางแตกหักง่าย มักเป็นไข้บ่อย เพราะติดเชื้อได้ง่าย ถ้าซีดมากหัวใจอาจวายได้ มักมีอายุไม่เกิน 10 ปี ส่วนผู้ที่มีอายุยาวนานจะมีเหล็กสะสม ในร่างกายมากเกินไป จนทำให้พยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆผิดปกติ เช่น ผิวคล้ำ ตับแข็ง ฯลฯ

3. β-thalassemia / Hb E disease เกิดจากการได้รับยีนเบต้า-ธาลัสซีเมียร่วมกับยีนฮีโมโกลบินอี ผู้ป่วยมักมีอาการของโรคปานกลางหรืออาจมีความรุนแรงเท่ากับ Thalassemia major

4. HbH disease เกิดจาก α-thalassemia 1 ร่วมกับ (_α/__) เหลือเพียงยีนเดียวซึ่งไม่เพียงพอต่อการใช้จับ O_2 ในกระแสเลือด ร่างกายจึงสร้างโกลบินชนิด γ (ในขณะเป็นเด็ก) และ β (ในขณะเป็นผู้ใหญ่) ออกมาเป็นจำนวนมาก แกมม่า-และเบต้า-โกลบินจึงร่วมตัวกันเองเกิดเป็น γ_4, β_4 เกิดเป็น Hb Barts' และ Hb H ตามลำดับพยาธิสภาพส่วนใหญ่มักเป็นปกติ

ยีนที่ควบคุมการสร้างของฮีโมโกลบิน

เส้นโพลีเป็ปไทด์แต่ละชนิดต่างก็มียีนที่ควบคุมโครงสร้างอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง (locus) หรือ 1 คู่นั่นเอง (เพราะโครโมโซมมีเป็นคู่) ยีนควบคุมโครงสร้างของสายโกลบินอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) 2 กลุ่ม คือ α-globin gene cluster อยู่บนโครโมโซม 16 มีขนาด 26 kb ประกอบด้วยยีน 5 ยีน เรียงจากปลาย 5' ไปหา 3' ดังนี้ δ_2, $\phi\delta_1$, $\phi\alpha_2$, $\phi\alpha_1$, α_2, α_1, θ_1 โดยยีน α ทั้งสองจะควบคุมการสร้างอัลฟา-โกลบิน ส่วนยีน δ จะควบคุมการสร้างซีต้า-โกลบิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญใน embryonic Hb สำหรับยีน φδ และ φα จะไม่สามารถสร้างโกลบินได้จึงเรียกว่า pseudogene ส่วนยีน θ_1 ทราบแต่เพียงว่าสามารถสังเคราะห์อาร์เอ็นเอได้แต่ในปริมาณค่อนข้างน้อย รายละเอียดยังไม่ทราบแน่ชัด และ β-globin gene cluster อยู่บนโครโมโซม 11 ซึ่งมีขนาดประมาณ 50 kb ประกอบด้วยยีน 6 ยีน เรียงจากปลาย 5'ไป 3' ดังต่อไปนี้ ε, G_γ, A_γ, φβ, δ, และ β โดยยีน δ มีหน้าที่สร้างโกลบินชนิดเดลต้า ยีนβ จะสร้างโกลบินชนิดเบต้า ส่วนยีน γ จะมีสองยีนใกล้กันและมีหน้าที่สร้างโกลบินชนิดแกมม่าและยีนชนิดเบต้า ส่วนยีนแกมม่าจะมีสองยีนใกล้กันจะมีหน้าที่สร้างโกลบินชนิด γ และยีน ε จะใช้สร้างโกลบินชนิด embryonic ดังแสดงในรูปที่1



รูปที่ 1 แสดงกลุ่มยีนเบต้าโกลบินและกลุ่มยีนอัลฟ่าโกลบิน ซึ่งมีความยาวประมาณ 80 และ 60 Kbตามลำดับ ยีน δ และ ε เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในช่วงที่เป็นเอมบริโอ ยีน $\phi\delta_1$, $\phi\alpha_2$, $\phi\alpha_1$, φβ เป็นยีนเทียม (pseudogene) ซึ่งได้เกิดมิวเตชั่นที่จุดต่าง ๆ ภายในยีน จนทำให้หมดหน้าที่ θ_1 เป็นยีนที่

3. การทำ autoradiography ของแผ่นกระดาษ nitrocellulose ต่อแผ่นฟิลม์เอ็กซ์เรย์กินเวลานานตั้งแต่ 3-7 วัน ทำให้เสียเวลาในการอ่านผลค่อนข้างนานมาก

4. สารกัมมันตภาพรังสี ^{32}P มีครึ่งอายุเพียง 14 วัน ทำให้ต้องเตรียมหรือสั่งซื้อมาตลอดเวลาทำให้ค่อนข้างยุ่งยากต่อการวินิจฉัยโรคมาก ไม่สามารถใช้กับโรงพยาบาลในชนบทหรือสถานที่ไกล ๆ ได้เพราะเสียเวลาการขนส่งที่ต้องแข่งกับอายุของ ^{32}P

5. การวินิจฉัยด้วยเทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องมือ Liquid Scintillation Counter ซึ่งเครื่องมือมีราคาแพงมาก ทำให้การวินิจฉัยโรคทำได้ในวงแคบ โรงพยาบาลระดับจังหวัดหรือชุมชนแทบไม่มีโอกาสได้ใช้เทคนิคนี้มาวินิจฉัยโรคเลย ด้วยเหตุผลข้างต้นหากเปลี่ยนการติดฉลาก probe ด้วย ^{32}P มาเป็นสารเคมีที่ให้สีแทนจะทำให้ลดอันตรายจากสารกัมมันตภาพรังสีไม่ต้องทำ autoradiography เตรียม Probe ครั้งเดียวสามารถใช้ได้นาน ไม่เสียความว่องไว, ใช้ probe ได้หลายครั้ง และไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง เป็นการประหยัดเงินและเวลาอีกทั้งสามารถพัฒนาการวินิจฉัยโรคนี้ไปสู่โรงพยาบาลขนาดเล็กได้อีกด้วย

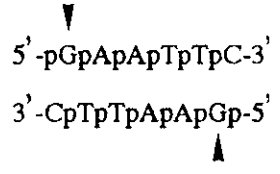
การวินิจฉัย α-thalssemia trait ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล ในผู้ใหญ่ทำได้ไม่ค่อยแม่นยำ ผู้ที่เป็น α-thalassemia trait ซีดเล็กน้อยระดับฮีโมโกลบินประมาณ 10 กรัม % หรือสูงกว่าเม็ดเลือดแดงขนาดเล็กติดสีน้อย อาจมี poikilocytosis และ basophilic stippling ไม่มากนัก แต่บางรายความผิดปกติดังกล่าวอาจน้อยมากจนตรวจไม่พบก็ได้ ส่วน α-thalassemia 2 trait มีลักษณะทางคลีนิกและทางโลหิตวิทยาปกติทุกประการ การวินิจฉัยจึงทำไม่ได้เลยในผู้ใหญ่

การวินิจฉัย α-thalassemia trait ทำได้ง่ายและแม่นยำในทารกแรกคลอดโดยนำ heamolysate ของ umbrilical cord blood มา run electrophoresis ถ้าพบ Hb Barts'(γ_4)ในปริมาณน้อยๆ คือ 0.5-8 % แสดงว่าเป็น α-thalassemia trait จากการศึกษาเช่นนี้พบว่า α-thalassemia trait ทำได้แม่นยำที่สุดโดยการตรวจดีเอ็นเอ

การวินิจฉัยทารกในครรภ์

เนื่องจากในปัจจุบันเทคโนโลยีด้านการเจาะตัดชิ้นรก (chorinic villus sampling, CVS) การเจาะน้ำคร่ำ (amniocentesis) การเจาะดูดเลือดทารกในครรภ์ (fetal blood sampling, FBS) และการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียโดยการตรวจดีเอ็นเอหรือโดยการสังเคราะห์สายโกลบินเจริญก้าวหน้ามาก จึงสามารถวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียในทารกในครรภ์ อายุ 9-11 สัปดาห์ (CVS) หรือ 16-20 สัปดาห์ (FBS หรือ anmiocentesis) ได้และถ้าพบว่าเป็นโรคธาลัสซีเมียก็อาจยุติการตั้งครรภ์โดยวิธีนี้ก็สามารถช่วยคู่สมรสที่เป็นพาหะทั้งคู่ไม่ให้มีลูกเป็นธาลัสซีเมียได้ โรคอัลฟา-ธาลัสซีเมียส่วนมากเกิดจากการขาด (deletion) ของยีน α-globin ซึ่งมีอยู่บนโครโมโซมที่ 16

ของคน มีขนาดประมาณ 25 Kb (1 Kb = 1,000 คู่เบส) ประกอบด้วยยีน 5 ชุด เรียงจากปลาย 5' ของสาย DNA ไปยังปลาย 3' ดังนี้ δ, φδ, φα, α_2, α_1 โดยยีน α_1, α_2 จะควบคุมคุมการสร้าง α-globin เมื่อนำดีเอ็นเอจากเซลล์ผู้ป่วยมาย่อยด้วย restriction enzyme ในที่นี้ใช้ *Eco*R I ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะอยู่ในกลุ่มเอ็นไซม์ endo-nuclease ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์เท่านั้น โดยตัดภายในเส้นของโพลีนิวคลีโอไทด์สายคู่ เอ็นไซม์กลุ่มนี้สามารถจดจำการเรียงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่เรียงจากปลาย 5' ไป
3' ของสายโพลีนิวคลีโอไทด์สายหนึ่ง เหมือนกับการเรียงจากปลาย 5' ไปสู่ 3' ของสายโพลีนิวคลีโอไทด์สายตรงข้ามได้ *Eco*R I สามารถตัดสาย DNA ที่มีการเรียงลำดับเบสดังนี้ 5'-GAATTC-3'



การตัดจะเกิดที่จุดลูกศรชี้ทั้งสอง ทำให้สามารถชี้ถึงการเรียงลำดับเบสตรงตำแหน่งนั้นได้ *Eco*R I ได้มาจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia Coli* สายพันธุ์ RY 13 แล้วตรวจชิ้นส่วนที่เกิดขึ้นด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ (ได้มาจากการสกัดพลาสมิดแบคทีเรีย ที่มีส่วนของ δ-gene มีขนาดประมาณ 1.9 Kb ที่ไฮบริไดซ์กับ DNA ของคนที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (ซึ่งจะไฮบริไดซ์เฉพาะกับ DNA ที่มีลำดับฟ้องจองกันพอดีแต่ไม่ไฮบริไดซ์เมื่อมีเบสผิดไปเพียงตัวเดียวเท่านั้น) และถูกซับอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาหาความเป็นไปได้ของการทำ non-radioisotope probe มาศึกษาหากลไกการของการเกิดโรคธาลัสซีเมีย

ประโยนช์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถวินิจฉัยหรือตรวจสอบคนป่วยโรคธาลัสซีเมียด้วยสารเคมี (biotin) แทนสารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P) ทำให้สามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ในโรงพยาบาลชนบท หรือชุมชนที่ไม่มีเครื่องมือวัดรังสีชนิด liquid scintillation counter ได้ และจะสามารถช่วยลดอันตรายแก่ผู้ที่ทำการตรวจวินิจฉัยโรค

2. สามารถนำไปใช้วินิจฉัยโรคอัลฟา-ธาลัสซีเมียในทารกก่อนคลอด (prenatal diagnosis) และสามารถให้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำแก่คู่แต่งงานที่เป็นโรค thalassemia trait ว่าถูกจะมีโอกาสเป็นโรค อัลฟา-ธาลัสซีเมียชนิดใดมากน้อยเพียงใด เพื่อให้คู่แต่งงานมีโอกาสตัดสินใจเลือกบุตรที่แข็งแรงปราศจากโรคได้