

วัตถุประสงค์ วัลส์ซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยและเป็นปัญหาใหญ่ที่สุดปัญหาหนึ่งในประเทศไทยและทั่วโลก ยุทธศาสตร์ในการแก้ไขปัญหาโรควัลส์ซีเมียที่ใช้ได้กว้างขวางที่สุดในปัจจุบันคือการควบคุมจำนวนการเกิดผู้ป่วยรายใหม่โดยการตรวจคัดกรองหาคอครวคู่เสี่ยงที่เป็นพาหะ ให้คำปรึกษาด้านพันธุกรรม ให้บริการการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดและสิ้นสุดการตั้งครรภ์ให้ในกรณีที่ทารกเป็นโรคชนิดรุนแรง ทางเลือกใหม่นอกเหนือจากการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดคือการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวของทารกซึ่งเป็นการเลือกตัวอ่อนที่ปราศจากโรคตั้งแต่ก่อนการตั้งครรภ์ช่วยให้คู่สมรสมีโอกาสเริ่มต้นการตั้งครรภ์ด้วยทารกที่ไม่เป็นโรค การวินิจฉัยก่อนคลอดต้องอาศัยการทำงานร่วมมือกันของผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางจากสาขาต่าง ๆ รวมถึง นรีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญในการทำทารกหลอดแก้ว นักวิทยาศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญในการดูแลตัวอ่อน นักอนุพันธุวิทยาผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยว และสูติแพทย์ผู้เชี่ยวชาญในการดูแลครรภ์ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการพัฒนาเทคนิคปฏิบัติการลูกโซ่เพื่อตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยวสำหรับโรคบีต้าวัลส์ซีเมียที่มีความรวดเร็ว ความไวสูง และถูกต้องแม่นยำ และทำการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวให้กับผู้ป่วย

วิธีการ คอครวคู่เสี่ยงที่อาจมีทารกเป็นโรคบีต้าวัลส์ซีเมียชนิดรุนแรงจำนวน 14 คู่ได้รับการให้คำปรึกษาในรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการนี้ คอครวจำนวน 2 คอครวที่เป็นพาหะโรคบีต้าวัลส์ซีเมียชนิดโคดอน 41-42 ดัดสนใจเข้าร่วมโครงการและผ่านการกระตุ้นรังไข่และการปฏิสนธิตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ตัวอ่อนได้รับการตัดตรวจในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิโดยใช้ลำแสงเลเซอร์ ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยวได้รับการตรวจวิเคราะห์เทคนิคปฏิบัติการลูกโซ่ชนิดเรืองแสงโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่วยให้สามารถวิเคราะห์โรคบีต้าวัลส์ซีเมียและตำแหน่ง microsatellite ซึ่งบอกการปนเปื้อนและการวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวนได้พร้อมกัน

ผลการศึกษา ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวคอครวแรก ตัวอ่อน 8 ตัวได้รับการตรวจ ตัวอ่อนที่ตรวจพบว่าปกติ 2 ตัวได้รับเลือกเพื่อใส่เข้าไปในโพรงมดลูก ทำให้เกิดการตั้งครรภ์ทารกปกติ 1 ครรภ์ ได้รับการยืนยันว่าทารกปกติจากการตรวจทั้งก่อนและหลังคลอด ทารกรายนี้คลอดสุขภาพสมบูรณ์ในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2548 ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวคอครวที่สอง ตัวอ่อน 9 ตัวได้รับการตรวจ ตัวอ่อนปกติ 1 ตัวและตัวอ่อนที่เป็นแฝง 1 ตัวได้รับเลือกเพื่อใส่เข้าไปในโพรงมดลูก แต่ไม่มีการตั้งครรภ์เกิดขึ้น มีตัวอ่อน 2 ตัวที่ให้ผลการตรวจเป็นกลุ่มอาการดาวน ทำให้อุบัติการณ์ของกลุ่มอาการดาวนในกรณีนี้เป็นร้อยละ 22.2 (2/9) ข้อมูลนี้ยังเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเนื่องจากมารดามีอายุเพียง 24 ปี

บทสรุป การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการประสานงานกันของความรู้ทางอนุพันธุวิทยาระดับนาโน (หนึ่งเซลล์มีดีเอ็นเอ 5 พิโคกรัม) และเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์สามารถให้ประโยชน์ในทางคลินิกต่อผู้ป่วยอย่างมหาศาล ช่วยให้ทางเลือกใหม่กับคอครวที่มีความเสี่ยงที่อาจมีบุตรเป็นโรคพันธุกรรมร้ายแรงและอาจจำเป็นต้องทำแท้งบุตร การศึกษานี้ได้สร้างโปรโตคอลใหม่ขึ้นมา 2 โปรโตคอลสำหรับการตรวจโรคบีต้าวัลส์ซีเมียโดยใช้ปฏิบัติการลูกโซ่ชนิดเรืองแสง โปรโตคอลทั้งสองได้ใช้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัว ได้รับความสำเร็จเป็นทารกปลอดโรคจากการวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวก่อนการฝังตัวคนแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Objectives Thalassaemias are prevalent and cause one of the biggest health problems in Thailand and world-wide. The most widely applicable strategy for dealing with thalassaemias has been to control the incidence of new cases by offering screening for heterozygotes, genetic counseling, and prenatal diagnosis (PND) with termination of pregnancy in affected cases. An alternative to routine PND is preimplantation genetic diagnosis (PGD) which allows selection of unaffected embryos prior to pregnancy establishment providing couples the chance to start a pregnancy with a disease-free baby. PGD requires a collaboration of specialists from different fields including a gynaecologist who performs *in vitro* fertilization (IVF), an embryologist who takes care of preimplantation embryos, a molecular biologist who is responsible for the diagnosis from single biopsied blastomeres and a perinatologist who looks after the pregnancy. The aim of this study was to develop and apply quick, sensitive and accurate single cell PCR protocols for PGD of beta-thalassaemia.

Methods Fourteen couples at risk of having an affected fetus with severe beta-thalassaemia were counseled regarding the project. Two couples carrying beta-thalassaemia codon 41-42 mutation decided to join the project and underwent routine superovulation and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. Cleavage stage embryo biopsy was performed using laser on Day-3 post-fertilisation and DNA from single cells was analysed using multiplex fluorescent PCR on a capillary electrophoresis. This permitted beta-thalassaemia mutation analysis and a microsatellite marker allowing contamination detection and diagnosis of trisomy 21 cases caused by meiosis I error.

Results In the first PGD case, eight embryos were tested and two normally diagnosed embryos were transferred. This resulted in an unaffected pregnancy, confirmed to be homozygous normal by pre- and post-natal testing. The baby was born healthy in June 2005 at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. The second PGD case involved analysis of nine embryos. One normal and one heterozygous embryo was transferred, however no pregnancy resulted. Two embryos were shown to be affected by Down's syndrome. These made the prevalence of trisomy 21 embryos be 22.2% (2/9) in this PGD cycle, interesting given that the mother was just 24 years old.

Conclusion This study indicates that the integration of molecular biology nano-techniques (single cell contains 5 picogrammes of DNA) and advanced reproductive technology (ART) can be clinically useful giving a new choice to the family at risk of having an affected child with serious disease without facing immoral pregnancy termination. Two novel PGD protocols for beta-thalassaemia using multiplex fluorescent single cell PCR were developed and optimised. The protocols were applied in two clinical PGD cycles and resulted in the first disease-free baby following PGD for a single gene disorder in Thailand and South East Asia.