



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน  
สำหรับโรคธาลัสซีเมีย

**PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS  
OF THALASSAEMIAS**

โดย รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล และคณะ

มิถุนายน 2552

โครงการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน  
สำหรับโรคธาลัสซีเมีย

**PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS  
OF THALASSAEMIAS**

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ศ.นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)



## สารบัญ

บทคัดย่อไทย.....	4
บทคัดย่ออังกฤษ.....	5
Executive Summary.....	6
เนื้อหางานวิจัย .....	8
- Introduction.....	8
- Patients and methods .....	9
- Results .....	13
- Discussion .....	24
ผลผลิตที่ได้จากโครงการ.....	26
ภาคผนวก 1 Manuscript.....	36
ภาคผนวก 2 การประชุมวิชาการ หนังสือและตำรา .....	57
ภาคผนวก 3 การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการฯ โดยสื่อมวลชนในรูปแบบสิ่งพิมพ์	
เนื่องในวโรกาสขึ้นครองราชย์ครบ 80 ปีของพระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช 8 พฤษภาคม 2551 .....	110
ภาคผนวก 4 การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการฯ โดยสื่อมวลชนในรูปแบบสิ่งพิมพ์	
จากการแถลงข่าวโดยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 14 มกราคม 2552 .....	128
ภาคผนวก 5 การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการฯ โดยสื่อมวลชนทางโทรทัศน์และวิทยุ.....	164

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** อัลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในโลกและเป็นปัญหาสำคัญในท้องถิ่นที่มีความชุกสูง โรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีความรุนแรงมากที่สุดหรือกลุ่มอาการทารกบวมน้ำฮีโมโกลบินบาร์ทเป็นสาเหตุของภาวะแทรกซ้อนร้ายแรงทางสรีรศาสตร์ทำให้เกิดการเสียชีวิตและทุพพลภาพของมารดา การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อนหรือการคัดตัวอ่อนเป็นทางเลือกใหม่ที่นอกเหนือไปจากการวินิจฉัยก่อนคลอด การคัดตัวอ่อนช่วยให้คู่สมรสที่มีความเสี่ยงเริ่มการตั้งครรภ์ได้โดยแน่ใจว่าทารกปลอดโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาโปรโตคอลการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียและทำการคัดตัวอ่อนให้ผู้ป่วยคู่เสี่ยง

**วิธีการ** ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ชนิดเรืองแสงจากเซลล์เดียวในการตรวจวิเคราะห์ยีนผิดปกติ ตรวจหาการปนเปื้อน และการตรวจวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องของยีน ครอบครัวคู่เสี่ยงที่เคยตั้งครรภ์ทารกเป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงตัดสินใจเข้าร่วมโครงการและทำการคัดตัวอ่อนจำนวนสองครั้ง

**ผลการศึกษา** ได้ออกแบบและทดสอบน้ำยาตรวจใหม่สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด<sup>-SEA</sup> โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ยีนถึง 5 ตำแหน่งพร้อมกัน ในการคัดตัวอ่อนครั้งแรก ผลการตรวจตัวอ่อน 14 ตัวอ่อน พบว่า ปกติ 2 ตัวอ่อน, แผล 5 ตัวอ่อน, เป็นโรค 5 ตัวอ่อน และไม่ได้ผลการตรวจสองตัวอ่อน ได้เลือกตัวอ่อนปกติ 1 ตัวอ่อนและแผล 2 ตัวอ่อนใส่ในหลอดลูก แต่ผู้ป่วยไม่ตั้งครรภ์ การคัดตัวอ่อนครั้งที่สองมีตัวอ่อนสำหรับการตรวจวินิจฉัย 8 ตัวอ่อน พบว่า ปกติ 1 ตัวอ่อน, แผล 1 ตัวอ่อน, เป็นโรค 3 ตัวอ่อน และไม่ได้ผล 3 ตัวอ่อน ได้เลือกตัวอ่อนแผล 1 ตัวอ่อนใส่ในหลอดลูก ได้ทารกเพศชาย 1 คนคลอดวันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ.2551 การวินิจฉัยก่อนคลอดยืนยันผลการวินิจฉัยก่อนการฝังตัว

**บทสรุป** การศึกษานี้ได้พัฒนาและทดสอบโปรโตคอลใหม่สำหรับการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด<sup>-SEA</sup> และได้ใช้ในการคัดตัวอ่อน 2 ครั้ง รายละเอียดการคัดตัวอ่อนและการตั้งครรภ์ได้รายงานไว้ในการศึกษา

## Abstract

**Objectives:** alpha-Thalassemia is the most common single gene disorder world-wide and causes significant problems in endemic area. The most severe form of alpha-thalassemia, Hb Bart's hydrops fetalis syndrome, causes serious obstetric complications which lead to maternal mortality and morbidity. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is an alternative to traditional prenatal diagnosis (PND) giving the couples at risk a chance to start a pregnancy with a disease free baby. This study aimed to develop a PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and perform clinical PGD cycles.

**Methods:** Single cell multiplex fluorescent PCR was employed for mutation analysis, contamination detection and linkage analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. A couple experienced termination of pregnancy following positive PND of alpha-thalassemia decided to join the project and two clinical PGD cycles were performed.

**Results:** A new set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation amplifying 5 fragments was designed and tested. Fourteen embryos were tested in the first PGD cycle showing two normal, five heterozygous, five affected and two with no result. One normal and two heterozygous embryos were chosen for transfer, no pregnancy was resulted. Eight embryos were analyzed in the second PGD cycle giving one normal, one heterozygous, three affected and three with no result. One heterozygous embryo was chosen for transfer on day 6, resulting in a baby boy born on the 2<sup>nd</sup> October 2008. PND confirmed heterozygous result of PGD.

**Conclusion:** Novel PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation was developed, tested and employed on two clinical PGD cycles. Clinical experience and pregnancy following PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation using multiplex fluorescent PCR protocol was reported here.

## Executive Summary

**Introduction** alpha-Thalassemia is the most common single gene disorder in the world and causes significant health and financial problems in endemic area. The most severe form of alpha-thalassemia (homozygous affected), Hb Bart's hydrops fetalis syndrome, causes serious obstetric complications, i.e. eclampsia, dystocia and obstetric hemorrhage, which lead to maternal mortality and morbidity. The aim of prenatal diagnosis (PND) for alpha-thalassemia is to prevent maternal mortality and morbidity. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) or embryo selection is genetic testing of preimplantation stage embryos for genetic diseases. PGD is an alternative to traditional PND giving the couples at risk a chance to start a pregnancy with a disease free baby. Consequently, the need for termination of affected fetus can be eliminated. This study aimed to develop a PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and perform clinical PGD cycles

**Patients and methods** Single cell multiplex fluorescent PCR was employed for mutation analysis, contamination detection and linkage analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. A couple carrying alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation who experienced termination of pregnancy following positive PND of alpha-thalassemia decided to join the project and two clinical PGD cycles were performed at Chiangmai University Hospital. Routine superovulation, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and cleavage stage laser biopsy was carried out on day-3 post-fertilization embryos. DNA from single cells was analyzed using capillary electrophoresis on an automated DNA sequencer.

**Results** A new set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation amplifying 5 fragments, including three normal fragments, one mutant fragment and a polymorphic linked marker D16S475 to alpha-globin gene family, was designed and tested. Multiplex fluorescent PCR protocol gave the overall amplification efficiency of 100% for the normal allele and 85.5% for the mutant allele. The microsatellite marker showed 90.9% amplification efficiency with ADO rate of 8%. Fourteen embryos were tested in the first PGD cycle giving two normal, five heterozygous, five affected and two with no result. One normal and two heterozygous embryos were chosen for transfer, however, no pregnancy was resulted. Eight embryos were analyzed in the second PGD cycle giving one normal, one heterozygous, three affected and three with no result. One heterozygous embryo was chosen for transfer on day 6, resulting in a baby boy born on the 2<sup>nd</sup> October 2008. PND confirmed heterozygous result of PGD. A total of 36 single biopsied blastomeres from two PGD cycles exhibited amplification efficiency of 72.2% and 63.8% and ADO rates of 19.2% and 30.4% for alpha-globin gene and polymorphic linked

marker D16S475. Distribution of normal, heterozygote and homozygous affected from a total of 24 embryos in two PGD cycles was 5(20.8%):11(45.8%):8(33.4%).

**Discussion** Homozygous alpha-thalassemia caused severe anemia and leads to high output heart failure and hydrops fetalis syndrome in utero. This fetal condition is lethal and frequently causes life threatening maternal complications. The strategy of disease control for alpha-thalassemia is to save life of the mothers. PGD is a preferable method than PND as it assures a healthy baby and eliminates the need for termination of affected pregnancy. This study demonstrated the integration of modern molecular biology nano-techniques and advanced reproductive technology (ART) giving an alternative to the family at risk of having an affected child with serious disease without facing immoral pregnancy termination. A novel PGD protocols for alpha-thalassaemia using multiplex fluorescent single cell PCR were developed and optimized. Compared to previously reported primer set, the use of newly designed primer set in this study offers the fail proof strategy in detecting three fragments of normal allele simultaneously in a single cell and backup linkage analysis result from a linked polymorphic marker D16S475, increasing specificity. In the first PGD cycle, there were enough embryos for selection. However, all good quality embryos were affected or arrested on day 4 and unaffected embryos chosen for transfer were of poorer quality. Therefore, no pregnancy was resulted. In the second PGD cycle, all embryos of best morphology were again was affected, but one was heterozygous. Fortunately the good quality embryo with heterozygous result chosen for transfer gave rise to a healthy pregnancy, the first birth following PGD of alpha-thalassemia in Thailand and the second reported world-wide. The accuracy of the protocol was confirmed by PND.

**Conclusion** Novel PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation using multiplex fluorescent gap single cell PCR was developed, tested and employed on two clinical PGD cycles. Clinical experience and first birth following PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> in Thailand was reported here.

**Acknowledgements** This project was supported by the National Research Council of Thailand, the Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education (grant no. MRG4980077) and Eisai (Thailand) Co., Ltd. Ovarian induction drugs were sponsored by Schering-Plough Organon (Thailand) Co., Ltd.

## เนื้อหางานวิจัย

### INTRODUCTION

alpha-Thalassemia is the most common single gene disorder in the world and causes significant maternal mortality in endemic area (Weatherall, 1996). alpha-Thalassemia is more common than beta-thalassemia but is less frequently found in the hospital due to lethal feature of the most severe form (homozygous affected) which leads to intrauterine death, while carriers are generally asymptomatic and do not need much health care attention. Homozygous affected of alpha-globin gene defective leads to absence of alpha-globin chain synthesis and causes Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. Mothers carrying these fetuses are likely to develop potentially life-threatening obstetric complications, i.e. eclampsia, dystocia and obstetric hemorrhage. Therefore, the aim of prenatal diagnosis (PND) for homozygous alpha-thalassemia is to prevent serious maternal mortality and morbidity.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the genetic testing of preimplantation stage embryos for inheritable single gene defects, allowing selection of unaffected embryos prior to establishment of pregnancy (Handyside *et al.*, 1989). This gives couples the chance to start a pregnancy with a disease free baby. Consequently, the need for termination of an affected pregnancy can be eliminated. Therefore, PGD is more preferable to conventional PND.

The aim of this study was to develop a single cell PCR protocol for PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and perform clinical PGD for couples at risk.

## PATIENTS AND METHODS

### ***Patient details***

The mother and father of family 'A' were 28 and 49 years old respectively. Both of the couple carried alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and experienced one termination of pregnancy following positive PND of alpha-thalassemia. The couple were counseled regarding the project and consent were obtained. This project was approved by the Research Ethics Committee, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

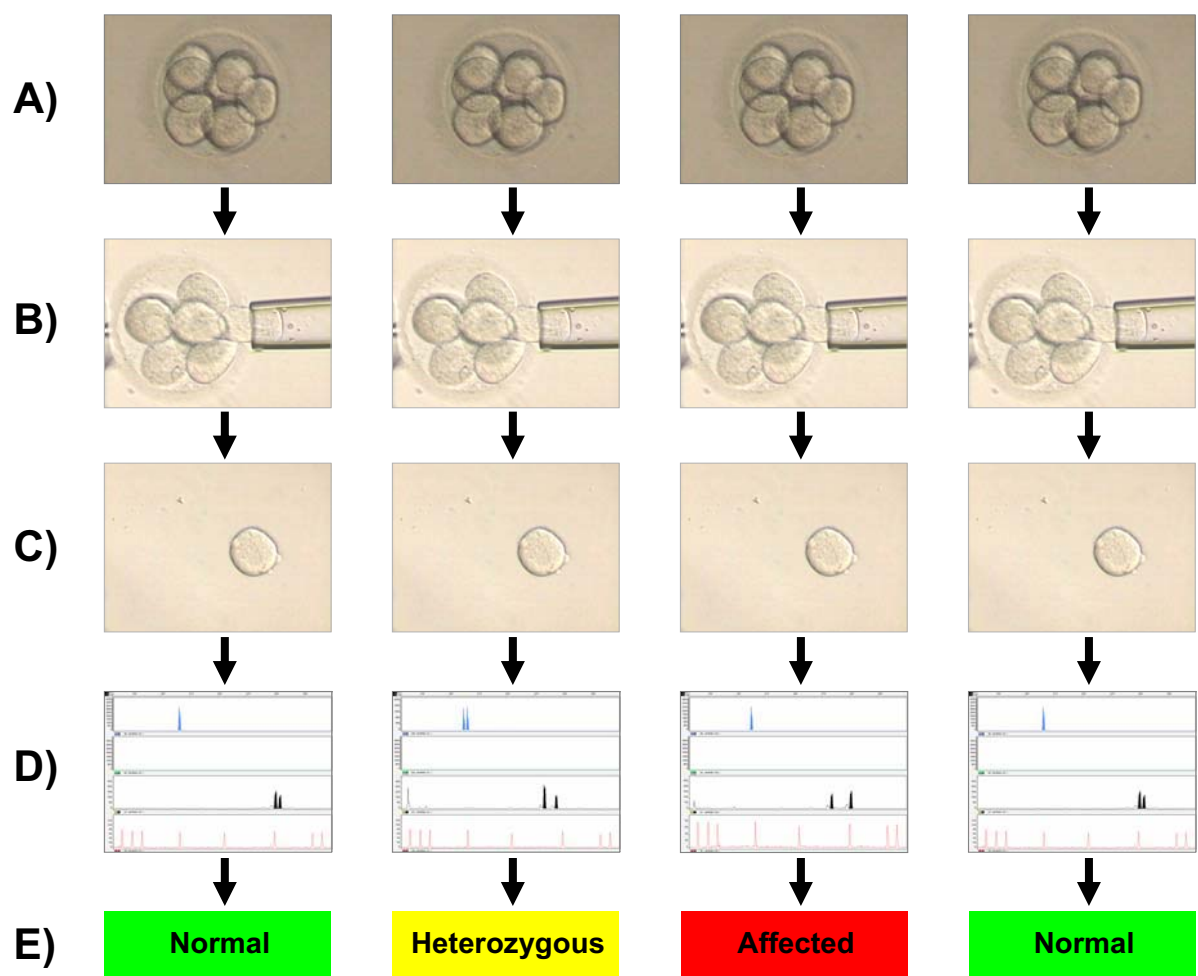
### ***ICSI procedure and cleavage stage embryo biopsy***

The patients underwent routine superovulation using recombinant FSH (Puregon<sup>®</sup> Pen, Schering-Plough Organon Thailand Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and synthetic decapeptide ganirelix (Orgalutran<sup>®</sup>, Schering-Plough Organon Thailand Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and oocytes were fertilized using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). ICSI was used as a precaution to reduce the risk of sperm DNA contamination in subsequent PCR amplification. Laser biopsy was performed on Day 3 post-fertilization (4–9 cell stage), allowing two blastomeres to be removed from embryos consisting of 6<sup>+</sup> cells and one blastomere from embryos with 4–5 cells (Figure 1). Cleavage stage embryos were graded 1, 2-, 2, 2+ and 3 where grade 1 had the best morphology and grade 3 was a highly fragmented, poor quality embryo (Staessen *et al.*, 1992).

### ***Single cell isolation***

Buccal cells, isolated by micromanipulation, and biopsied blastomeres were transferred into droplets of phosphate-buffered saline (PBS) (GibcoBRL<sup>®</sup>, GibThai Co., Ltd., Chiang Mai, Thailand) with 4% bovine serum albumin (BSA) (Sigma<sup>®</sup>, S.M. Chemical Supplies Co., Ltd., Chiang Mai, Thailand) on a 5 cm Petri dish in a laminar flow cabinet. Cells were washed in a minimum of four fresh PBS droplets, while visualizing under a dissecting microscope, and were then transferred to thin-wall microcentrifuge tubes. A 2 µl aliquot of the last washing drop was also taken as a blank for each single blastomere. Cell lysis was carried out as described previously (El-Hashemite and Delhanty, 1997)

**Figure 1** Preimplantation genetic diagnosis (PGD) or embryo selection of alpha-thalassemia: A) Day 3 cleavage stage embryos from in vitro fertilization (IVF), B) a blastomere is taken from an embryo using a micromanipulator, C) single blastomere from each embryo for DNA analysis, D) DNA analysis results from multiplex fluorescent single cell PCR, E) Unaffected embryos are chosen for transfer. IVF and Embryo biopsy procedures was performed by TV, single cell PCR was performed by WP.





### ***Multiplex fluorescent PCR***

Extracted DNA from single cells was amplified using a combination of W1, W2, W3 and W4 primers as gap PCR for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation detection, W5 and W6 as internal control fragment of alpha-globin gene family and a microsatellite D16S475 flanking to alpha-globin gene for contamination detection and linkage analysis (Table 1) (Piyamongkol *et al.*, 2001). Multiplex fluorescent PCR was performed as previously described (Piyamongkol *et al.*, 2006). Multiplex amplified products from single cells were each tagged with different fluorochromes using labeled primers. This allowed analysis to be performed on an automated laser fluorescent sequencer ABI Prism<sup>®</sup> 3130xl (Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand) (Hattori *et al.*, 1992).

### ***Fragment analysis***

A mixture of 1 µl fluorescent PCR products, 10 µl deionized formamide and 0.1 µl size standard (Genescan<sup>™</sup>-500 LIZ<sup>®</sup>; Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand) was prepared and denatured at 95°C for 5 min. The denatured sample was subjected to capillary electrophoresis using Performance Optimized Polymer 7 (POP-7<sup>®</sup>, Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand; 50 s injection time, 15,000 V, 60°C, 20 min) on an automated DNA sequencer ABI Prism<sup>®</sup> 3130xl (Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand). The data was analyzed by GeneMapper<sup>®</sup> software version 4.0 (Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand).

**Table 1** Details of primers for alpha-thalassemia-SEA mutation analysis.

Primers	Sequences	Labeling dye	References
W1	5'-GAA GGA GGG GAG AAG CTG AG-3'	FAM-B	NCBI: NG_000006
W2	5'-TGT GGA AAA GTT CCC TGA GC-3'	-	
W3	5'-TGC ACA CCT ATG TCC CAG TT-3'	-	
W4	5'-TTG AGA CGA TGC TTG CTT TG-3'	VIC-G	
W5	5'-GCC ACT GCC TGC TGG TG-3'	PET-R	NCBI: NG_000006
W6	5'-AGG TCA GCA CGG TGC TCA C-3'	-	
D16S475F	5'-AGG GGT TGA CAG AGT GAG ACT CC-3'	NED-Y	GDB: 198327
D16S475R	5'-CAG GAA CAG AAA ATA CTG CAC GG-3'	-	

## RESULTS

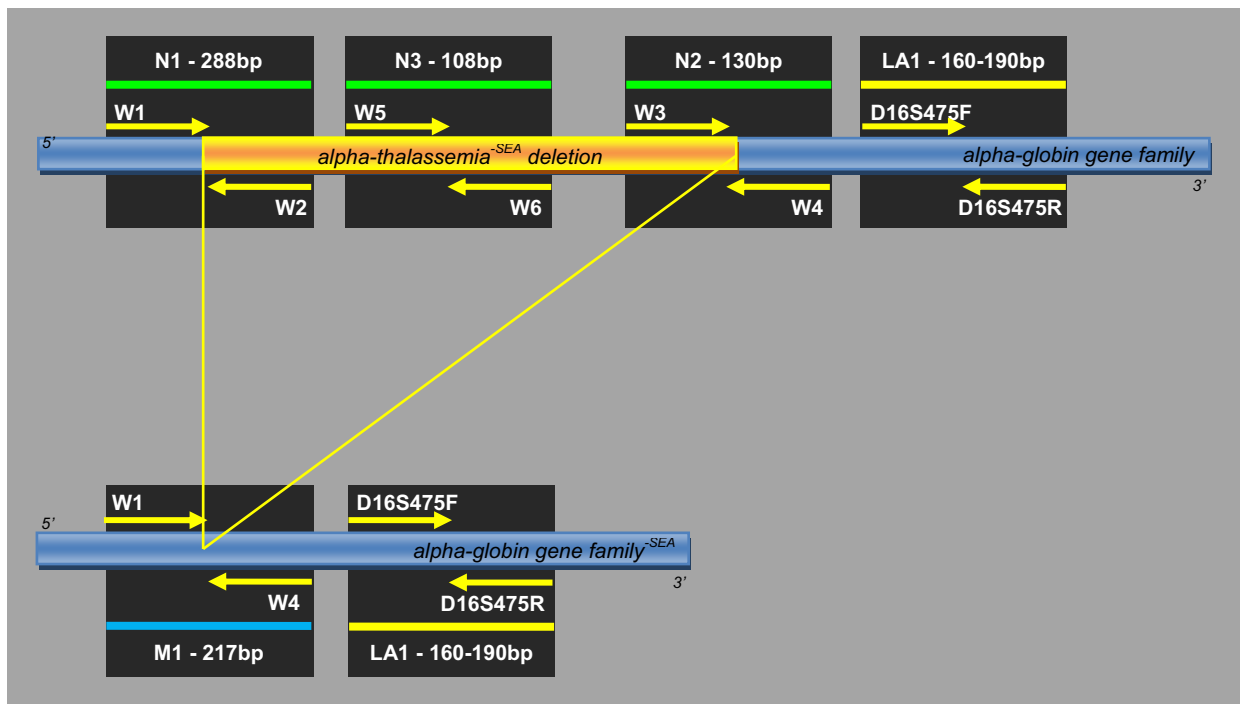
### Design of novel primers for alpha-Thalassemia<sup>-SEA</sup> analysis

New set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation analysis, including W1, W2, W3 and W4 primers were designed as gap PCR, W5 and W6 primers were employed as internal control fragment of alpha1 exon3 within alpha-globin gene family (NCBI: NG\_000006) and D16S475 (GDB: 198327) microsatellite flanking to alpha-globin gene for contamination detection and linkage analysis. In a normal genotype sample, W1-W2 primer pair amplifies 5' end breakpoint of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and W3-W4 primer pair amplifies 3' end breakpoint of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. In a homozygous mutant genotype sample, W1-W4 primer pair amplifies deleted breakpoint of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation (Figure 2). W1, W4, W5 and D16S475 forward primers were labeled with blue (6-FAM<sup>®</sup>), green (VIC<sup>®</sup>), red (PET<sup>®</sup>) and yellow (NED<sup>®</sup>) fluorescent dyes, respectively. In a normal sample, amplification of W1-W2, W3-W4 and W5-W6 primer pairs gives rise to 288bp blue N1, 130bp green N2 and 108bp red N3 fragments of normal alpha-globin gene. In a homozygous alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion sample, W1-W4 primer pair gives rise to 217bp blue&green M1 fragment of deletion breakpoint (Figure 2).

### *Preclinical assessment of methodology*

From 55 single buccal cells of the couples, multiplex fluorescent PCR showed an amplification efficiency of 78.2% for N1, 96.4% for N2, 96.4% for N3 fragments giving the overall amplification efficiency of 100% for normal alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> allele and 85.5% for M1 fragment of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion allele. D16S475 showed an amplification efficiency of 90.9% with 8% allele drop out rate. The application of the protocol on 25 spare single human blastomeres donated for research showed an acceptable overall amplification efficiency of 84% for both normal alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> allele and D16S475 fragment.

**Figure 2** Diagram showing alpha-globin gene family and alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion with primers map.



### ***Preimplantation diagnosis results***

PGD cycle 1 for family 'A' gave 14 oocytes, all were sperm injected and all 14 embryos were good quality for biopsy on day 3 post-fertilization. Mutation analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> from single biopsied blastomeres exhibited four embryos to be normal (A2, A8, A13, A14), two heterozygous (A4, A9), six affected (A5, A6, A7, A10, A11, A12) and two without result (A1, A3) (Table 2). Analysis of D16S475 fragment flanking to alpha-globin gene showed no contamination in all biopsied blastomeres. Linkage analysis of D16S475 fragment confirmed mutation analysis of two normal (A8, A13), one heterozygous (A4) and four affected embryos (A6, A7, A11, A12), while linkage analysis suggested heterozygous results in two normal (A2, A14) and one affected (A5) mutation analysis results, revealing the possibility of ADO. One normal (A14) and two heterozygous (A4, A8) embryos were chosen for transfer on day 4, unfortunately, no pregnancy was resulted.

Ten oocytes were collected and sperm injected in PGD cycle 2 of family 'A'. Eight embryos were good enough for biopsy on day 3. Mutation analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> showed one embryo to be normal (B8), one heterozygous (B2), three affected (B4, B5, B7) and three without result (B1, B3, B6). No contamination was detected. Linkage analysis results confirmed affected result in one embryo (B4). One heterozygous embryo (B2) was chosen for transfer on day 6 at blastocyst stage, one pregnancy was resulted. PND by fetal blood sampling confirmed heterozygous genotype of the fetus. A disease-free baby boy, 3,280 g, was born on 2<sup>nd</sup> October 2008.

Working up results of family 'A' confirmed heterozygous genotype of both of the parents showing 288bp blue N1, 130bp green N2 and 108bp red N3 fragments of normal allele and 217bp blue&green M1 fragment of mutant allele of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation (Figure 3 and 4). Homozygous affected genotype of their first fetus was confirmed by showing only 217bp blue&green M1 fragment of mutant allele of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation (Figure 5) without any of the normal allele. D16S475 linkage locus exhibited 164bp/170bp and 166bp/180bp alleles for the mother and the father, respectively (Figure 3 and 4). Their Hb Bart's fetus acquired 170bp and 180bp mutant linked alleles from the mother and the father, respectively (Figure 5), therefore, maternal 164bp allele and paternal 166bp allele should be linked to the normal allele. Multiplex fluorescent PCR on normal control sample from an unrelated subject gave only 288bp blue N1, 130bp green N2 and 108bp red N3 of normal allele (Figure 6). Subsequent PGD analysis of blastomere A4.1 demonstrated heterozygous genotype with 164bp normal linked allele and 180bp mutant linked allele from the mother and the father, respectively (Figure 7). Normal genotype blastomere A8.2 showed 164bp and 166bp normal linked allele from both of the parents (Figure 8).

Summarizing the data of a total of 36 single biopsied blastomeres from 2 clinical PGD cycles gave amplification efficiency of 72.2% (26/36) and 63.8% (23/36), ADO rates of 19.2% (5/26) and 30.4% (7/23) for alpha-globin gene and D16S475 locus, respectively. Follow-up analyses were performed on the untransferred embryos. For this purpose whole embryos were transferred to PCR tubes and subjected to the same protocol as used for the actual PGD. The initial diagnosis was confirmed in all cases. No contamination was detected. A total of 24 embryos, including untransferred embryos and two arrested embryos (B9 and B10), in this study (Table 2) revealed 5 normal, 11 heterozygous and 8 affected embryos.

**Table 2** Preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassaemia<sup>-SEA</sup> mutation results of family 'A', cycle 1 (embryos A1-A14) and cycle 2 (embryos B1-B9).

Embryo no.	Embryo grade (no. of cells) before biopsy (Day 3)	Cells taken (n)	Cell no.	alpha-Thal <sup>-SEA</sup> results	Microsatellite linked marker (D16S475) results	Diagnosis	Outcomes	Confirmation results
A1	2 <sup>+</sup> (8)	2	A1.1	No result	No result	No result	Untransferred	Ht <sup>**</sup>
			A1.2	Lysed				
A2	3 (6)	2	A2.1	Normal	NC <sup>***</sup> , suggestive of Ht	Normal or Ht	Untransferred (arrested)	Ht
			A2.2	Lysed				
A3	3 (8)	2	A3.1	No result	No result	No result	Untransferred	Ht
			A3.2	No result	No result			
A4	2 <sup>+</sup> (9)	2	A4.1	Ht	NC, suggestive of Ht	Ht	ET <sup>****</sup> (early blastocyst)	-
			A4.2	Ht	NC, suggestive of Ht			
A5	2 (7)	2	A5.1	Affected	NC, suggestive of Ht	Affected or Ht	Untransferred	Ht
			A5.2	No result	No result			
A6	1 (8)	2	A6.1	Affected	NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
			A6.2	Affected	NC, suggestive of Affected			
A7	1 (8)	2	A7.1	Affected	No result	Affected	Untransferred	Affected
			A7.2	Affected	NC, suggestive of Affected			
A8	3 (8)	2	A8.1	Normal	NC, suggestive of Normal	Normal	ET (morula)	-
			A8.2	Normal	NC, suggestive of Normal			
A9	1 (7)	2	A9.1	Ht	No result	Ht,	Untransferred	Ht
			A9.2	Ht	Allele drop-out			
A10	1 (8)	2	A10.1	Affected	No result	Affected	Untransferred	Affected
			A10.1	No result	Allele drop-out			
A11	1 (8)	2	A11.1	Affected	NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
			A11.2	No result	Allele drop-out			
A12	2 <sup>+</sup> (7)	2	A12.1	Affected	NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
			A12.2	Affected	NC, suggestive of Affected			
A13	2 <sup>+</sup> (7)	2	A13.1	Normal	Allele drop-out	Normal	Untransferred (arrested)	Normal
			A13.2	Normal	NC, suggestive of Normal			
A14	2 <sup>+</sup> (9)	2	A14.1	Normal	No result	Normal or Ht	ET (early blastocyst)	-
			A14.2	Normal	NC, suggestive of Ht			
B1	2 <sup>+</sup> (8)	2	B1.1	No result	No result	No result	Untransferred	Normal
			B1.2	No result	No result			
B2	1 (8)	2	B2.1	Ht	Allele drop-out	Ht	ET (blastocyst)	Ht (PND)
			B2.2	Ht	Allele drop-out			
B3	2 <sup>+</sup> (7)	2	B3.1	No result	No result	No result	Untransferred	Normal
			B3.2	Lysed				
B4	1(7)	2	B4.1	Affected	NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
			B4.2	Lysed				
B5	1(7)	2	B5.1	Affected	Allele drop-out	Affected	Untransferred	Affected
			B5.2	Lysed				
B6	2 <sup>+</sup> (5)	1	B6.1	No result	No result	No result	Untransferred	Normal
B7	1(6)	1	B7.1	Affected	No result	Affected	Untransferred	Affected
B8	1(5)	1	B8.1	Normal	No result	Normal	Untransferred	Ht
B9	1(4)	0	-	-	-	-	Untransferred	Ht
B10	1(4)	0	-	-	-	-	Untransferred	Ht

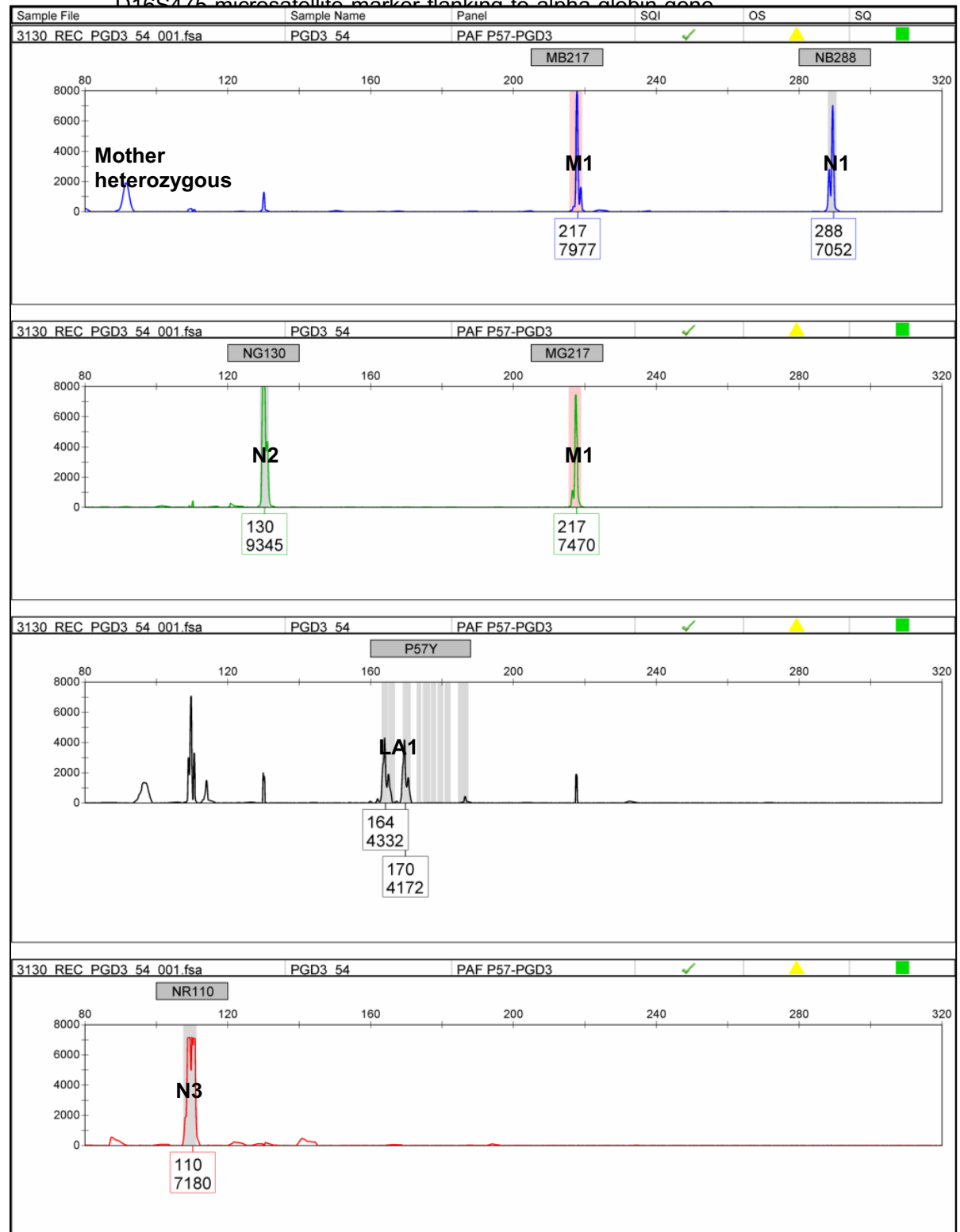
\* Embryos were graded 1, 2<sup>+</sup>, 2, 2<sup>+</sup> and 3 where grade 1 had the best morphology and grade 3 was a highly fragmented, poor quality embryo

\*\* Ht = Heterozygous

\*\*\* NC = No contamination detected

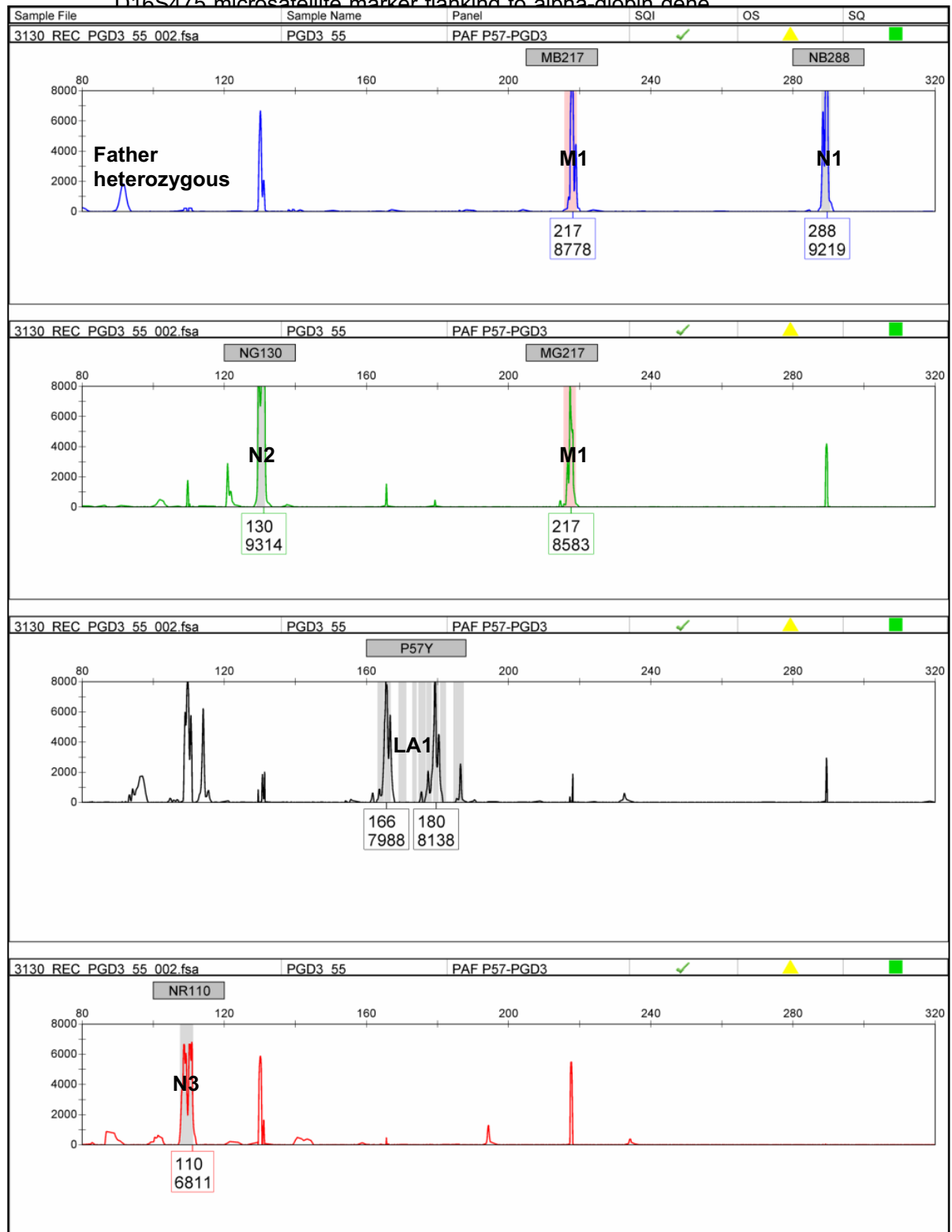
\*\*\*\* ET = Embryo transferred

**Figure 3** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Heterozygous sample of mother of family 'A' with positive normal (blue-N1, green-N2, red-N3) and mutant (blue&green-M1) fragments is shown. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha globin gene

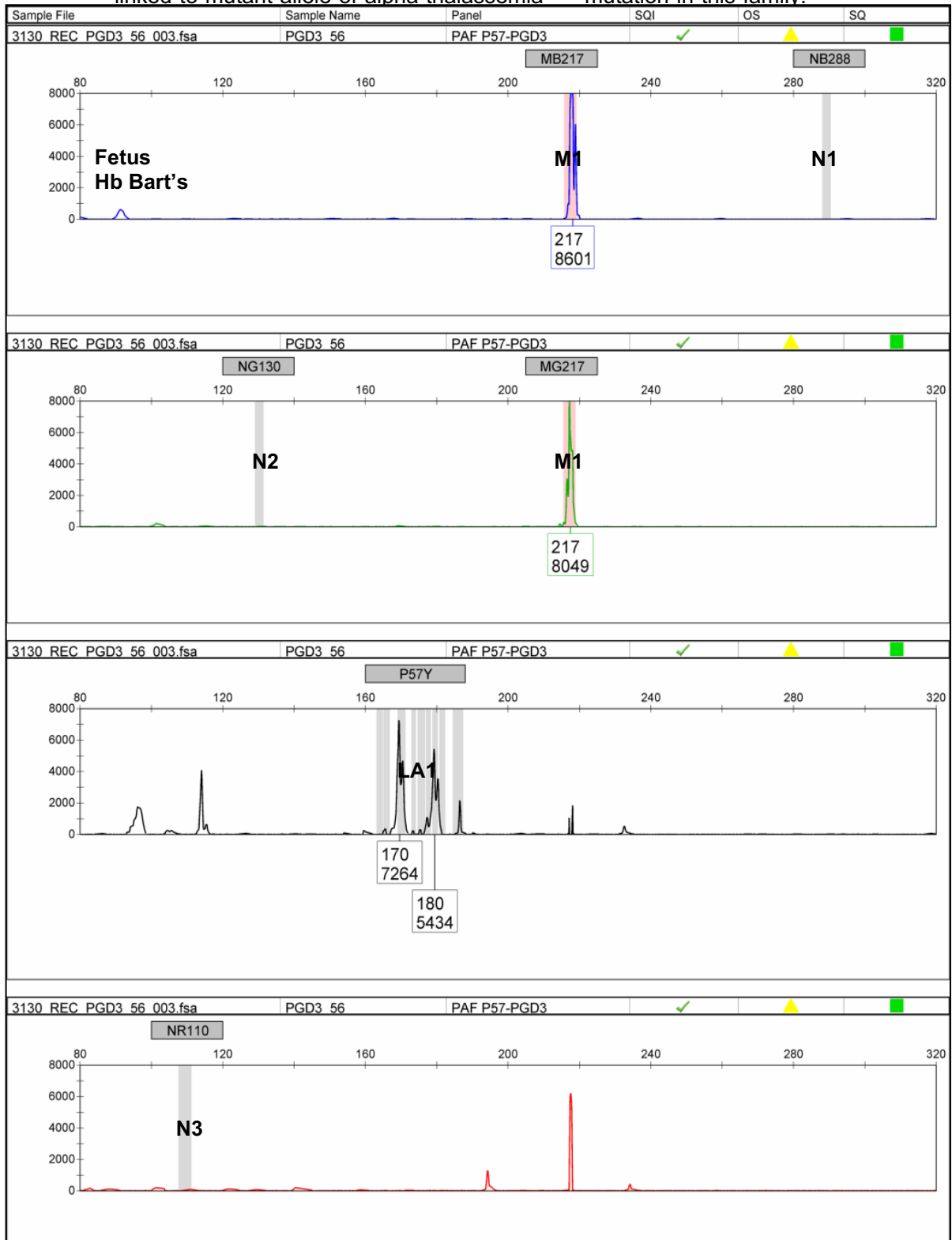




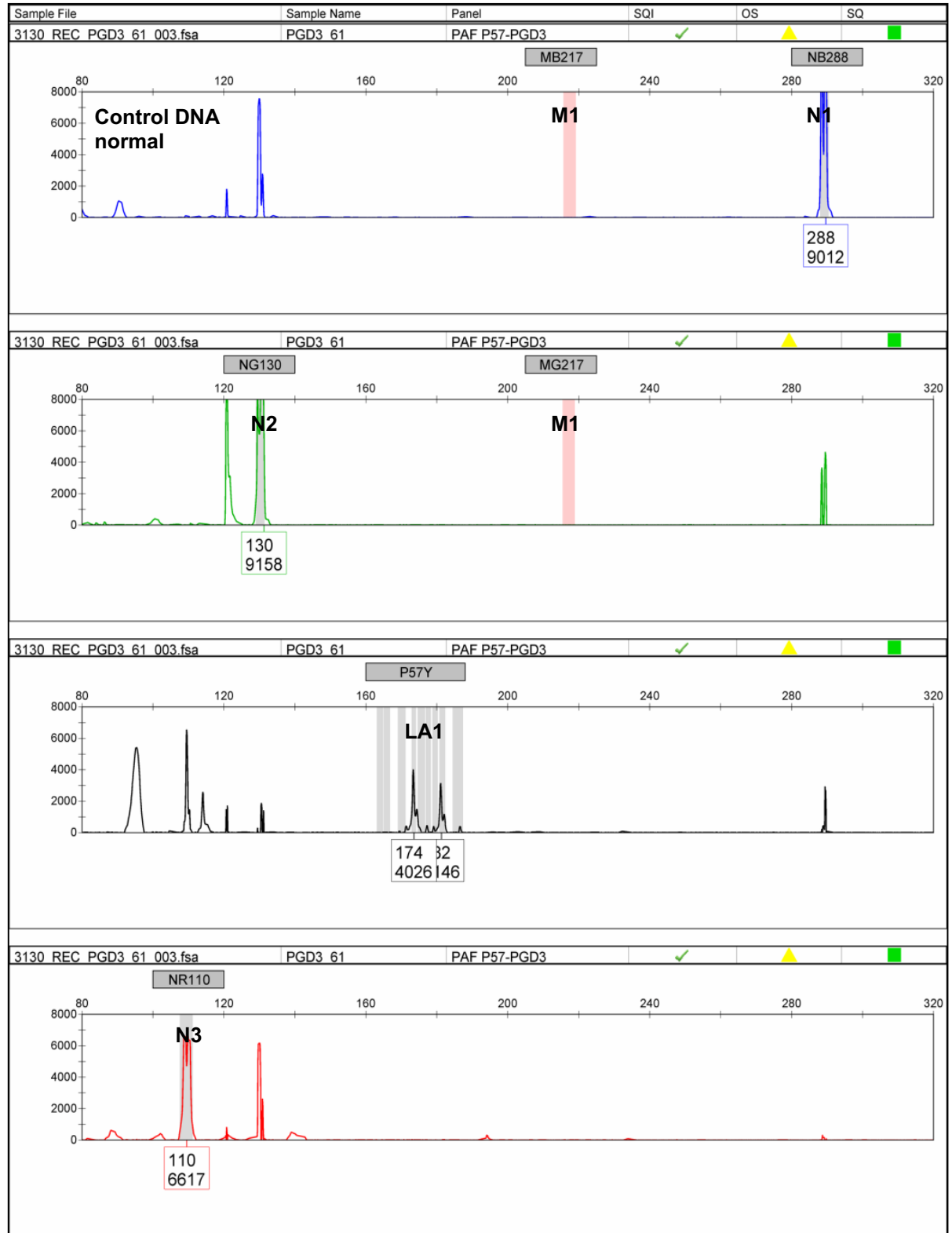
**Figure 4** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Heterozygous sample of father of family 'A' with positive normal (blue-N1, green-N2, red-N3) and mutant (blue&green-M1) fragments is shown. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene



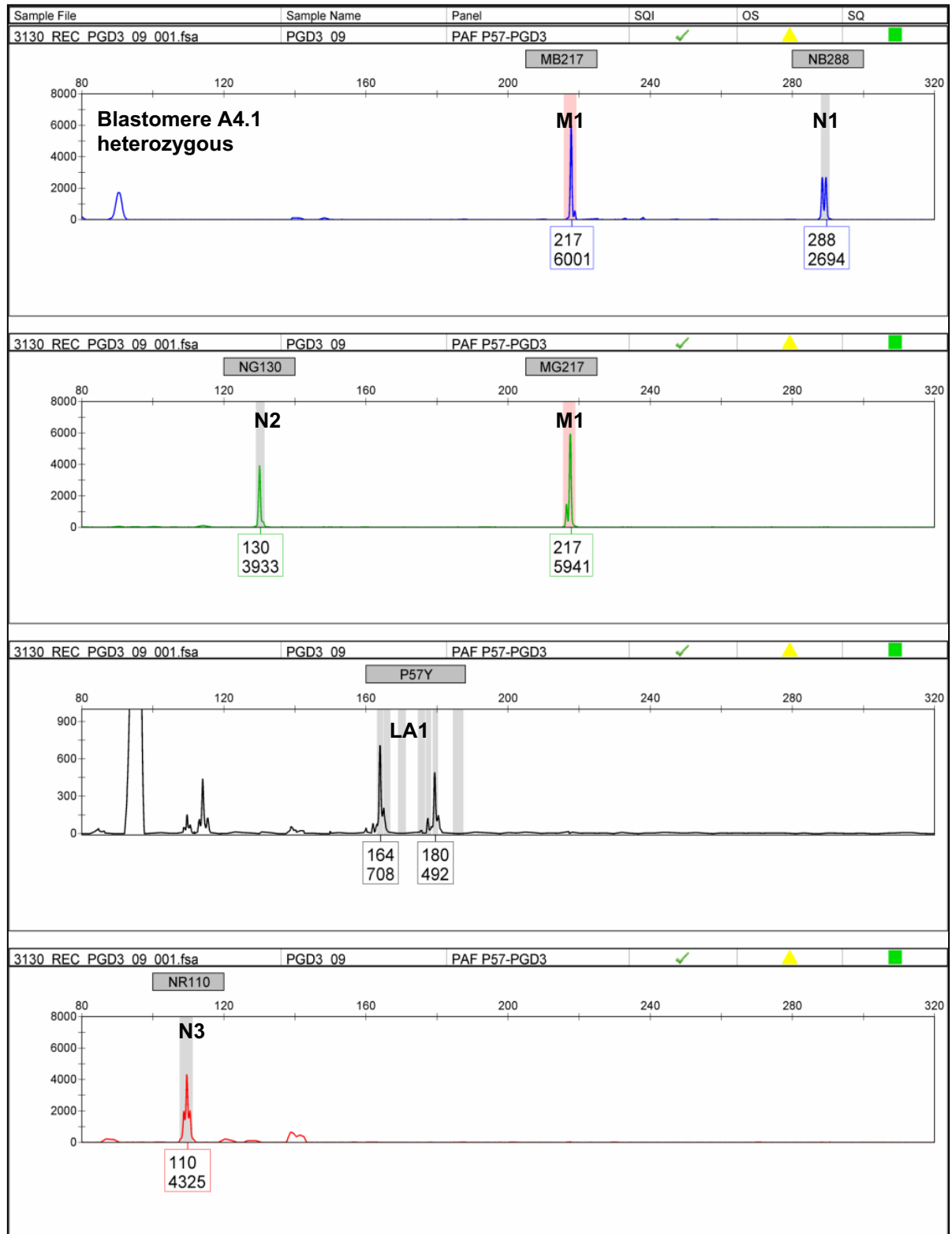
**Figure 5** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130x/ for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Homozygous affected sample of Hb Bart's fetus of the couple 'A' with positive only mutant (blue&green-M1) fragment is demonstrated. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene, 170bp and 180bp alleles are linked to mutant allele of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation in this family.



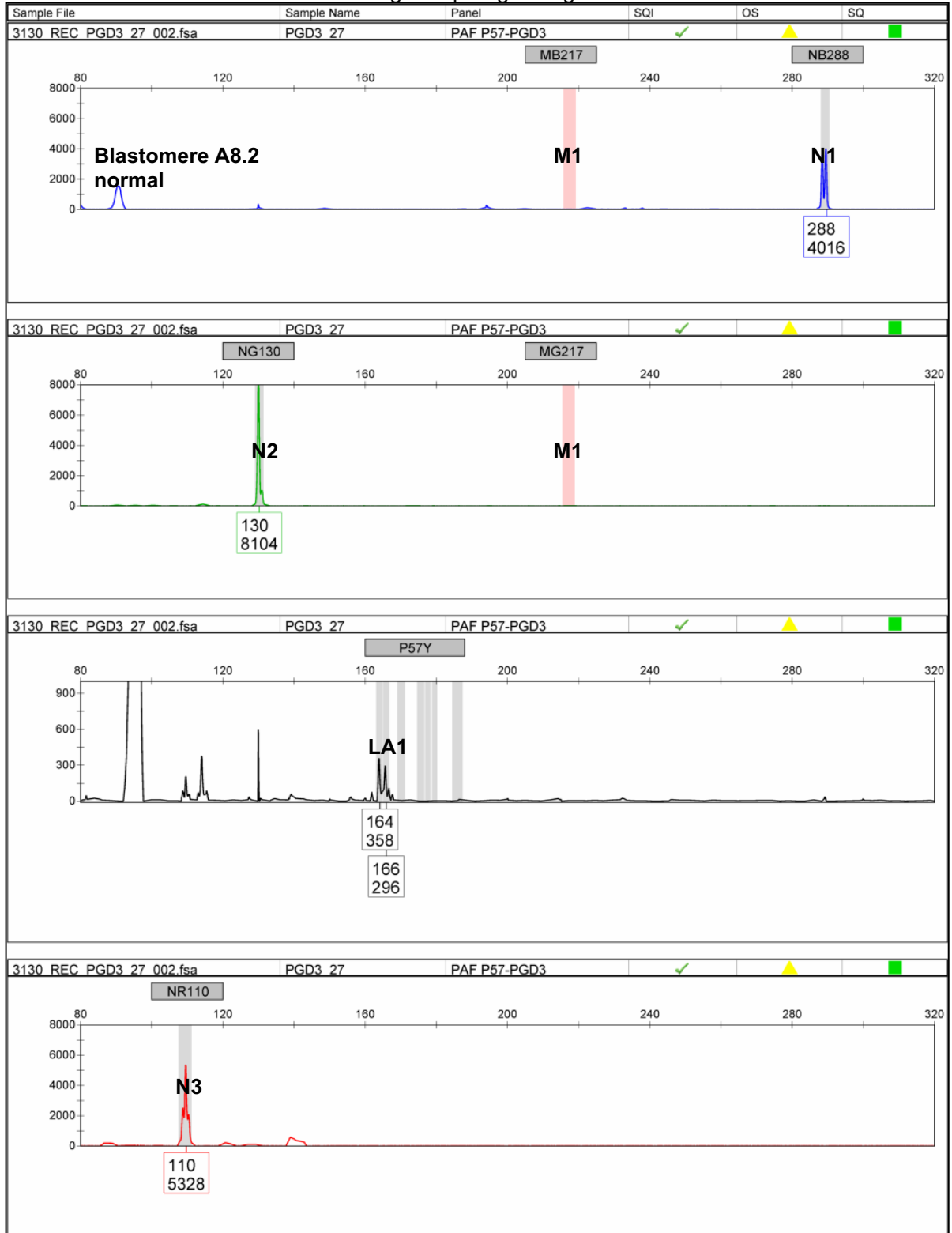
**Figure 6** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Normal control sample with positive only normal (blue-N1, green-N2, red-N3) fragments is demonstrated.



**Figure 7** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Heterozygous single biopsied blastomere from clinical PGD for family 'A' with positive normal (blue-N1, green-N2, red-N3) and mutant (blue&green-M1) fragments is shown.



**Figure 8** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130x/ for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Normal single biopsied blastomere from clinical PGD for family 'A' with positive only normal (blue-N1, green-N2, red-N3) fragments is shown. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene.



## DISCUSSION

Homozygous genotype of alpha-thalassemia causes severe anemia which leads to high output heart failure and hydrops fetalis syndrome in utero. Fetal hydropic phenotype always causes serious maternal complications. Prior to the era of heterozygotes screening and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia, several mothers to such homozygous alpha-thalassemia fetuses in Thailand died from eclampsia or hemorrhage every year. The introduction of prenatal control of severe thalassaemia: Chiang Mai strategy (Tongsong *et al.*, 2000) helps in early detection of homozygous alpha-thalassemia fetuses and termination of pregnancy before maternal complications begin, eliminating maternal death. Application of PGD provides the advantage over traditional PND in avoiding termination of affected pregnancy and its complications. PGD of alpha-thalassemia should be demanding, but there have not been many reports on it (Wells and Delhanty, 2001).

In this study, a new set of primers was developed and tested as gap PCR for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> and was employed in clinical PGD. In addition, Primers amplifying an internal control of normal fragment within alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion were included in the protocol. A microsatellite marker flanking to alpha-globin gene family was also included for contamination detection and back up linkage analysis results. In the final PGD protocol, multiplex fluorescent PCR using 4 sets of primers amplifying 5 fragments was successfully done on heterozygote single cells. Preclinical workup of novel PGD protocol on single buccal cells and single spared blastomeres gave acceptable amplification efficiency and ADO.

Comparing with previously designed primers for gap PCR (Ko *et al.*, 1992) which amplify 5' end breakpoint of normal allele and mutant allele, new protocol in this study amplify both 5' end and 3' end breakpoint of normal allele and mutant allele with different annealing sites. In addition, internal control fragment within the breakpoint is also employed. Therefore, novel protocol in this study amplifies three fragments of the normal allele. Traditional primers amplify one fragment for each of normal and mutant alleles, in case of polymorphism of alpha-globin gene sequences which causes amplification failure of either normal or mutant alleles would lead to misdiagnosis. Results of one of the three fragments of normal allele can rescue diagnosis results of the single blastomere in case of ADO of the second or third primers for normal allele (Piyamongkol *et al.*, 2003) as demonstrated in the preclinical workup results in this study that amplification efficiency for normal alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> allele using this new set of primers reached 100%. Detecting normal allele is crucial for diagnosis of normal and heterozygous genotypes in autosomal recessive disorders. Moreover, a polymorphic marker next to the breakpoint is also included for backup linkage analysis results as a fourth fail proof diagnostic clue.

Preliminary 14 embryos in the first PGD cycle were enough for selection. Only 2 embryos with poor quality on day 3 failed to give analysis results, diagnosis could be drawn from 12 embryos. However, all embryos with best quality (Grade 1) either were affected (embryos A6, A7, A10 and A11) or arrested on day 4 (embryo A9). Three un-affected embryos (embryos A4, A8 and A14) chosen for transfer were of poorer quality on day 3. Although, these embryos developed well on day 4 into morula and blastocyst stage, none implanted.

There were 8 embryos for biopsy at the beginning of the second PGD cycle, only 6 (embryos B1, B2, B3, B4, B5 and B7) were with 6-8 cells. Three (embryos B1, B3 and B6) failed to give diagnosis result, probably due to the poor quality of the biopsied blastomeres. Moreover, affected result was concluded in three embryos (embryos B4, B5 and B7). Therefore, there were not many choices of un-affected embryos with good quality for transfer. From three embryos with best morphology, two (embryos B4 and B5) were affected while the third (embryo B2) was heterozygous. Luckily the heterozygous embryo with best quality (embryo B2) developed very well after biopsy, was chosen for transfer and gave rise to a healthy pregnancy.

From 22 embryos in two clinical PGD cycles (Table 2), mutation analysis demonstrated 5 normal, 3 heterozygous, 9 affected and 5 without result. In addition to showing no contamination in all single blastomeres, linkage analysis results using D16S475 locus confirmed mutation analysis results in two normal, one heterozygous and 5 affected embryos, while suggested two normal and one affected results to be heterozygous embryos indicating ADO of those blastomeres. This demonstrated the benefit of the incorporating D16S475 analysis for back up linkage analysis results in addition to contamination detection purpose. Confirmation analysis of untransferred embryos revealed the overall genotyping distribution to be 5 (20.8%) normal, 11 (45.8%) heterozygous and 8 (33.4%) affected. As expected, ADO made heterozygotes ratio lower than actual prevalence while normal and homozygous affected ratio higher than actual. This event would not lead to misdiagnosis, but a reduced number of heterozygous embryos for transfer, subsequently, possibly a lower pregnancy rate. There is a notice that ADO problem did not deteriorate the accuracy of diagnosis in this study because of the fail proof design of PCR protocol.

In conclusion, novel PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> using multiplex fluorescent single cell PCR was developed, tested and clinically applied in two PGD cycles. New set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation was designed for detecting three fragments of the normal allele and one fragment of the mutant allele as a fail proof technique. In addition, a microsatellite next to alpha-globin gene was included for contamination detection and backup linkage analysis information. This multiplex gap PCR protocol can be useful for PGD as well as PND. First birth following PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> in Thailand was reported here.

### ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

1. โดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้มีการจัดซื้อเครื่องตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA Sequencer) เป็นมูลค่า 11 ล้านบาท เพื่อใช้สำหรับโครงการนี้และโครงการวิจัยอื่น ๆ ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. คิดค้นออกแบบและทดสอบ primers ชุดใหม่สำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด<sup>-SEA</sup> ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจทั่วไป การวินิจฉัยก่อนคลอด และการวินิจฉัยก่อนการฝังตัว
3. คิดค้นออกแบบและทดสอบการใช้ primers สำหรับตำแหน่งภายในยีน alpha-globin (internal normal control fragment) เพื่อเพิ่มความแม่นยำของการตรวจวินิจฉัย ซึ่งไม่เคยมีผู้ใดทำมาก่อน
4. คิดค้นออกแบบและทดสอบการใช้ตำแหน่งที่อยู่ติดกับยีน alpha-globin ในการตรวจวิเคราะห์ linkage analysis เพื่อเพิ่มความแม่นยำของการตรวจวินิจฉัย ซึ่งไม่เคยมีผู้ใดทำมาก่อน
5. คิดค้นออกแบบและทดสอบการใช้ primers ถึง 4 คู่ในการตรวจวิเคราะห์ยีน 5 ตำแหน่งพร้อมกัน จากเซลล์เดียวได้สำเร็จ ซึ่งไม่เคยมีผู้ใดทำมาก่อน
6. ทำการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียเป็นจำนวน 2 ครั้งให้กับครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่บุตรอาจเป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงโดยใช้โปรโตคอลที่สร้างขึ้นใหม่
7. ได้ทราบปราศจากโรคอัลฟาธาลัสซีเมียจากการประสบความสำเร็จการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวคนแรกในประเทศไทยและครั้งที่สองของโลก
8. การจัดเตรียมต้นฉบับจากการรวบรวมการทำงานและผลผลิตที่ได้จากโครงการนี้เพื่อส่งไปยังวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติเพื่อรับการพิจารณาการตีพิมพ์เผยแพร่
9. ความสำเร็จของโครงการนี้ได้รับความสนใจและนำเสนอข่าวโดยสื่อมวลชนโดยทางโครงการไม่ได้เสียค่าใช้จ่าย โดยได้รับการนำเสนอในช่วงข่าวของสถานีโทรทัศน์ทุกช่อง หัวข้อข่าวหน้าหนึ่งหรือหน้าในของหนังสือพิมพ์ทุกฉบับ รับเชิญสัมภาษณ์รายการสถานีโทรทัศน์และสถานีวิทยุหลายสถานี หัวข้อสนทนาใน website ที่มีคนสนใจเข้าอ่านหลายแห่ง ในการนี้ ผู้วิจัยได้กล่าวขอบคุณผู้สนับสนุนโครงการ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง วช., สกอ. และ สกว. ทุกครั้ง นอกจากนี้ยังเป็นโอกาสในการประชาสัมพันธ์ความสำคัญและแนวทางในการดูแลรักษาโรคธาลัสซีเมียให้ประชาชนมีความรู้ความเข้าใจ หากจะนับเป็นค่าใช้จ่ายในการประชาสัมพันธ์องค์กรและโครงการก็จะเป็นมูลค่าหลายสิบล้านบาท ซึ่งในความเป็นจริง แม้จะมีโครงการและมีงบประมาณที่ต้องการจะประชาสัมพันธ์ในลักษณะนี้ ก็ไม่สามารถกระทำตัวเองหากสื่อมวลชนไม่ให้ความสนใจ



**การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมียโดย  
สื่อมวลชน เนื่องในวันธาลัสซีเมียโลก 8 พฤษภาคม 2551**

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการร่วมด้วยช่วยกัน ช่วงคลินิกสุขภาพ กรุงเทพฯ FM 96.00 MHz  
สำนักข่าวไอ.เอ็น.เอ็น. วันพุธที่ 14 พฤษภาคม 2551 เวลา 13.00-14.30 น. หัวข้อ “การ  
วินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการสถานีสุขภาพ สถานี สวท. กรุงเทพฯ FM 92.50 MHz กรม  
ประชาสัมพันธ์ วันพุธที่ 14 พฤษภาคม 2551 เวลา 15.30-16.00 น. หัวข้อ “การวินิจฉัยก่อน  
การฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์สด สถานีโทรทัศน์ช่อง NBT รายการ “คุยกับหมอสวนดอก” วันพุธที่ 4  
มิถุนายน 2551 เวลา 15.30-16.00 น หัวข้อ “การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมีย”  
(ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการสร้างเสริมสุขภาพกับหมอสวนดอก FM 100 MHz สถานีเสียง  
สื่อสารมวลชน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันพุธที่ 13 สิงหาคม 2551 เวลา 20.00-20.30 น.  
หัวข้อ “การเลือกตัวอ่อนสำหรับโรคธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการคุยข่าวสุขภาพกับหมอสวนดอก FM 93.25 MHz สถานีวิทยุแห่ง  
ประเทศไทย เชียงใหม่ วันเสาร์ที่ 16 สิงหาคม 2552 เวลา 10.30-11.00 น. หัวข้อ “การเลือก  
ตัวอ่อนสำหรับโรคธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการคุยข่าวสุขภาพกับหมอสวนดอก AM 639 MHz สถานีวิทยุแห่ง  
ประเทศไทย เชียงใหม่ วันจันทร์ที่ 18 สิงหาคม 2552 เวลา 06.00-06.30 น. หัวข้อ “การ  
เลือกตัวอ่อนสำหรับโรคธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

หัวข้อข่าวหน้าสอง หนังสือพิมพ์ Bangkok Post ฉบับวันอาทิตย์ที่ 11 พฤษภาคม 2551 “New  
screening test to ward off thalassemia” (ภาคผนวก 3)

หัวข้อข่าวหน้า 14 หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน ฉบับวันจันทร์ที่ 12 พฤษภาคม 2551 “แพทย์  
ไทยเจ๋งสกัด “ธาลัสซีเมีย” ช่วยพ่อแม่พาหะมีลูกไม่เป็นโรค” (ภาคผนวก 3)

หัวข้อข่าวหน้า A7 หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ ฉบับวันจันทร์ที่ 12 พฤษภาคม 2551 “แพทย์ไทย  
เจ๋งแก้ธาลัสซีเมียสำเร็จครั้งแรก” (ภาคผนวก 3)

หัวข้อข่าวหน้า 10 หนังสือพิมพ์มติชน ฉบับวันอังคารที่ 13 พฤษภาคม 2551 “แพทย์ไทยวิจัย ‘พี  
จีดี’ ช่วยคู่สมรสได้ลูกไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียสำเร็จ” (ภาคผนวก 3)

หัวข้อข่าวหน้า 19 หนังสือพิมพ์เชียงใหม่นิวส์ ฉบับวันเสาร์ที่ 17 พฤษภาคม 2551 “แพทย์มช.  
คิดค้นตัวอ่อนไม่ติดธาลัสซีเมียสำเร็จ” (ภาคผนวก 3)

บทความหน้า 16-18 ข่าวสารคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีที่ 23 ฉบับที่ 5  
เดือนมิถุนายน 2551 “เทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัว”  
(ภาคผนวก 3)

พาดหัวข่าวหน้าหนึ่ง แพทยศาสตร์สาร รายปักษ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ปีที่ 9 ฉบับที่ 133 ประจำวันที่ 16-30 มิถุนายน 2551 “แพทย์ มช. ค้นพบทางเลือกใหม่สำหรับ  
คู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 3)

**การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียโดยสื่อมวลชน เนื่องในแถลงข่าวโดยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 14 มกราคม 2552**

รับเชิญให้แถลงข่าวความสำเร็จ “การคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ห้องประชุมชั้น 2 อาคารเฉลิมพระบารมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 10.00-11.00 น.

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 3** ข่าว “เรื่องเด่นเย็นนี้” วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 17.56 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 3** ข่าว “ข่าววันใหม่” วันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 เวลา 01.29-01.34 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 3** ข่าว “ข่าวเช้าวันใหม่” วันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 เวลา 04.10-04.18 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 3** ข่าว “30 Young แจ๋ว” วันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 เวลา 09.52-09.56 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์สด **สถานีโทรทัศน์ช่อง 3** ข่าว “ข่าวเที่ยงวันทันเหตุการณ์” วันจันทร์ที่ 19 มกราคม 2552 เวลา 12.05-12.20 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 7** ข่าว “เด็ดข่าวดึก” วันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 เวลา 01.52 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 7** ข่าว “เช้าด่วนเด็ด 7 สี” วันพุธที่ 21 มกราคม 2552 เวลา 05.09-05.14 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง 9** ข่าว “ข่าวค่ำ” วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 19.32 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง NBT** ข่าว “ข่าวท้องถิ่นภาคเหนือ” วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 16.30 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

**สถานีโทรทัศน์ช่อง NBT** ข่าว “Hot News” วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 21.19-21.26 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์สด สถานีโทรทัศน์ช่อง **NBT** รายการ “คุยกับหมอสวนดอก” วันพุธที่ 21 มกราคม 2552 เวลา 15.30-16.00 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

สถานีโทรทัศน์ช่อง **Thai PBS** ข่าว “ข่าวภาคค่ำ” วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 19.08-19.14 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

สถานีโทรทัศน์ช่อง **Thai PBS** ข่าว “ข่าวดึก” วันพุธที่ 14 มกราคม 2552 เวลา 24.17-24.20 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

สถานีโทรทัศน์ช่อง **Nation Channadel** ข่าว “ห้องข่าวรับอรุณ” วันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 เวลา 06.38-06.44 น. หัวข้อ “แพทย์เชียงใหม่ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย” (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการสร้างเสริมสุขภาพกับหมอสวนดอก **FM 100 MHz** สถานีเสียงสื่อสารมวลชน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันพุธที่ 28 มกราคม 2552 เวลา 20.00-20.30 น. (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการคุยข่าวสุขภาพกับหมอสวนดอก **FM 93.25 MHz** สถานีวิทยุแห่งประเทศไทย เชียงใหม่ วันเสาร์ที่ 31 มกราคม 2552 เวลา 10.30-11.00 น. (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการคุยข่าวสุขภาพกับหมอสวนดอก **AM 639 MHz** สถานีวิทยุแห่งประเทศไทย เชียงใหม่ วันจันทร์ที่ 2 กุมภาพันธ์ 2552 เวลา 06.00-06.30 น. (ภาคผนวก 5)

รับเชิญสัมภาษณ์ รายการเรื่องราวจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ **FM 100 MHz** สถานีวิทยุเสียงสื่อสารมวลชน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันศุกร์ที่ 6 กุมภาพันธ์ 2552 เวลา 17.50 - 18.00 น. (ภาคผนวก 5)

หัวข้อข่าวหน้า 4 หนังสือพิมพ์ **Bangkok Post** ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 “Baby born to parents suffering thalassemia” (ภาคผนวก 4)

หัวข้อข่าวหน้า 2B หนังสือพิมพ์ **The Nation** ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 “Babies can be born free of thalassemia” (ภาคผนวก 4)

หัวข้อข่าวหน้า 9 หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 “มช.ทำสำเร็จ ไอวีเอฟเด็กปลอดยีนเลือดจาง” (ภาคผนวก 4)

หัวข้อข่าวหน้าหนึ่ง หนังสือพิมพ์มติชน ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 “ ‘หมอไทย’ ก้องโลกคัดตัวอ่อนสำเร็จช่วยแม่ ‘ธาลัสซีเมีย’ มีลูกปลอดภัย” (ภาคผนวก 4)

หัวข้อข่าวหน้าหนึ่ง หนังสือพิมพ์มติชน ฉบับวันศุกร์ที่ 16 มกราคม 2552 “ ‘แพทย์มช.’ เจ๋งคัดตัวอ่อนสำเร็จแม่ ‘ธาลัสซีเมีย’ มีลูกได้ปลอดภัย” (ภาคผนวก 4)

หัวข้อข่าวหน้า 19 หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ ฉบับวันศุกร์ที่ 16 มกราคม 2552 “ผู้ป่วยโรคเลือดเฮ แพทย์ช่วยมีลูกได้” (ภาคผนวก 4)

- หัวข้อข่าวหน้าหนึ่ง หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันศุกร์ที่ 16 มกราคม 2552 “แพทย์มช.เจ๋งได้  
ทารกปลอดโรค ธารัสซีเมีย” (ภาคผนวก 4)
- หัวข้อข่าวหน้าหนึ่ง หนังสือพิมพ์คมชัดลึก ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 “แพทย์มช.เยี่ยม  
เพาะเด็กปลอดโรคเลือดอัลฟาธารัสซีเมีย” (ภาคผนวก 4)
- หัวข้อข่าวหน้าหนึ่ง หนังสือพิมพ์คมชัดลึก ฉบับวันศุกร์ที่ 16 มกราคม 2552 “แพทย์มช.เยี่ยม  
เพาะเด็กปลอดโรคเลือดคิวยาวเหยียด” (ภาคผนวก 4)
- พาดหัวข่าวหน้าหนึ่ง หนังสือพิมพ์ไทยนิวส์ ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม 2552 “แพทย์มช.ทำ  
สำเร็จทารกคนแรกของไทยผลจากการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธารัสซีเมีย” (ภาคผนวก 4)
- หัวข้อข่าวหน้า 3 หนังสือพิมพ์ไทยนิวส์ ฉบับวันพุธที่ 21 มกราคม 2552 “ผลงานคณะแพทย์ มช.  
กับการต้านโรคธารัสซีเมีย” (ภาคผนวก 4)
- สัปดาห์หน้า 1 หนังสือพิมพ์เชียงใหม่นิวส์ ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 26 กุมภาพันธ์ 2552 “มช.เจ๋ง!! วิจัย  
สำเร็จคัดตัวอ่อนอัลฟาธารัสซีเมีย” (ภาคผนวก 4)
- บทความหน้า 19-20 ข่าวสารคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1  
เดือนมกราคม 2552 “ทีมแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ประสบความสำเร็จคัดตัวอ่อนสำหรับ  
โรคอัลฟาธารัสซีเมีย รายแรกในประเทศไทย” (ภาคผนวก 4)
- พาดหัวข่าวปกหน้า Eisai Bonding The Generations. ปีที่ 4 ฉบับที่ 4 มกราคม-มีนาคม 2552  
“ความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคแอลฟาธารัสซีเมีย”
- พาดหัวข่าวหน้าหนึ่ง แพทยศาสตร์สาร รายปักษ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ปีที่ 10 ฉบับที่ 147 ประจำวันที่ 16-30 มกราคม 2552 “แพทย์ มช. ประสบความสำเร็จคัดตัว  
อ่อนสำหรับโรคอัลฟาธารัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และนับเป็นครั้งที่สองของโลก”  
(ภาคผนวก 4)
- พาดหัวข่าวหน้าหนึ่ง ข่าวรอบสัปดาห์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีที่ 4 ฉบับที่ 9 ประจำวันที่ 23  
กุมภาพันธ์ - 1 มีนาคม 2552 “แพทย์ มช. ประสบความสำเร็จคัดตัวอ่อนอัลฟาธารัสซีเมียครั้ง  
แรกของประเทศไทย” (ภาคผนวก 4)

## รับเชิญบรรยาย/การนำเสนอผลงานวิจัยนี้ในการประชุมวิชาการ

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Role of Molecular Biology in Obstetrics – Modern Single Gene Disorders Diagnosis Techniques.” ในการประชุมวิชาการ The 21<sup>st</sup> Scientific Congress of the Royal Thai College of Obstetricians and Gynaecologist and the Second Collaboration with Royal Australian and New Zealand College of Obstetricians and Gynaecologists “Challenges in Reproductive Health for Thailand in the Next Decade” วันที่ 24-27 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Role of Molecular Biology in Obstetrics” ในการสัมมนา Cell and Molecular Biology Seminar Series วันที่ 31 สิงหาคม 2550 เวลา 12.00-13.00 น. ณ ห้องประชุม ห้องสมุด ชั้น 5 อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Sanguansermisri T. Development of Multiplex Fluorescent Single Cell PCR Protocol for Preimplantation Genetic Diagnosis of alpha-Thalassemia. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี (ภาคผนวก 2)

Piyamongkol W, Piyamongkol S, Sanguansermisri T. Real-Time PCR for Prenatal Genetic Diagnosis of beta-Thalassemia. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 22 ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ วันที่ 29 ตุลาคม – 1 พฤศจิกายน 2550 ณ อาคารเฉลิมพระบารมี ๕๐ ปี หอประชุมวิจิตรถนอม เพชรบุรีตัดใหม่ กรุงเทพฯ (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายและอบรมเรื่อง “PGD & PGS Its Place in Modern ART” ในการประชุมวิชาการเชิงปฏิบัติการ “Chiang Mai International Workshop on A.R.T. 2007” วันที่ 10-14 ธันวาคม 2550 ณ ชั้น 15 อาคารสุจินโณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาคผนวก 2)

Piyamongkol W, Vutyavanich T, Sanguansermisri T. Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 23 ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย “Optimal Women’s Health Care for Daily Practice” วันที่ 12-15 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี (ภาคผนวก 2)

Piyamongkol W, Vutyavanich T, Sanguansermisri T. Preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายและอบรมเรื่อง “Preimplantation Genetic Diagnosis” ในการประชุมวิชาการ Prenatal Control of Severe Thalassemia วันที่ 3-4 ธันวาคม 2551 ณ ชั้น

15 อาคารสุจินโณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สนับสนุนการจัดอบรมโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายและอบรมเรื่อง “Current Status of PGD & PGS” ในการประชุมวิชาการเชิงปฏิบัติการ “Chiang Mai International Workshop on A.R.T. 2009” วันที่ 13-16 มกราคม 2552 ณ ห้องประชุม ชั้น 15 อาคารเฉลิมพระบารมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Preimplantation Genetic Diagnosis” ในการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 33 สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย “เทคนิคการแพทย์กับระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ” วันที่ 28 เมษายน – 1 พฤษภาคม 2552 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่ (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Preimplantation Genetic Diagnosis” ในการประชุมวิชาการชมรมเวชศาสตร์มารดาและทารกในครรภ์ (ไทย) ร่วมกับ ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 7 ประจำปี 2552 “Humanized Health Care in Maternal and Fetal Medicine” วันที่ 6-8 พฤษภาคม 2552 ณ ห้องเพชรบุรี 1-3 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีชชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Preimplantation Genetic Diagnosis” ในการประชุมวิชาการ ศ.เกียรติคุณ ดร.นพ.ปัญญา กุลพิกุล ประจำปี 2552 “ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา” จัดโดย คณะจารย์แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 12-14 พฤษภาคม 2552 ณ ห้องบรรยาย 2 (ชั้น 12) อาคาร 12 ชั้น คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Preimplantation genetic diagnosis” ในการประชุมวิชาการประจำปี 2552 ของสมาคมอนามัยเจริญพันธุ์ (ไทย) ร่วมกับ ชมรมเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์แห่งประเทศไทย “Happy Sex and Reproduction” วันที่ 18-19 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมมณเฑียร สุรวงศ์ กรุงเทพฯ (ภาคผนวก 2)

วิทยาการรับเชิญในการบรรยายเรื่อง “Preimplantation Genetic Diagnosis for Thalassemia” ในการประชุมวิชาการธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 7 “Prenatal Diagnosis and Preimplantation Genetic Diagnosis in Thalassemia” วันที่ 14 กรกฎาคม 2552 ณ ห้องประชุมเอกาทศรถ 1 ชั้น 3 อาคารสิรินธร โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

## การประชุมวิชาการ, หนังสือและตำราที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในโครงการนี้

**Piyamongkol W.** Role of molecular biology in obstetrics – Modern single gene disorders diagnosis techniques. *J Med Assoc Thai* 2006;89:S186-91.

วีรวิทย์ ปิยะมงคล. เวทีวิจัย “โครงการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมีย”. *Medical Time*. 2551: 9(207): 37-38. (ภาคผนวก 2)

**Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Sanguansermisri T.** Development of Multiplex Fluorescent Single Cell PCR Protocol for Preimplantation Genetic Diagnosis of alpha-Thalassemia. ใน: บทคัดย่อ การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี หน้า 377. (ภาคผนวก 2)

**Piyamongkol W, Piyamongkol S, Sanguansermisri T.** Real-Time PCR for Prenatal Genetic Diagnosis of beta-Thalassemia. ใน: บทคัดย่อ การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 22 ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย เนื่องในโอกาสสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ วันที่ 29 ตุลาคม – 1 พฤศจิกายน 2550 ณ อาคารเฉลิมพระบารมี ๕๐ ปี ซอยศูนย์วิจัย ถนนเพชรบุรีตัดใหม่ กรุงเทพฯ หน้า 217. (ภาคผนวก 2)

**Piyamongkol W, Vutyavanich T, Sanguansermisri T.** Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia. ใน: บทคัดย่อ การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 23 ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย “Optimal Women’s Health Care for Daily Practice” วันที่ 12-15 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี หน้า 213. (ภาคผนวก 2)

**Piyamongkol W, Vutyavanich T, Sanguansermisri T.** Preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia. ใน: บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบบรรยาย การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี 2551: 73. (ภาคผนวก 2)

วีรวิทย์ ปิยะมงคล. Preimplantation Genetic Diagnosis. *J Med Tech Assoc Thai* 2009: 33(1): 51-57. (ภาคผนวก 2)

วีรวิทย์ ปิยะมงคล. Preimplantation Genetic Diagnosis. ในหนังสือประกอบการประชุมวิชาการชมรมเวชศาสตร์มารดาและทารกในครรภ์ (ไทย) ร่วมกับ ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 7 ประจำปี 2552 “Humanized Health Care in Maternal and Fetal Medicine” วันที่ 6-8 พฤษภาคม 2552 ณ ห้องเพชรบุรี 1-3 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี หน้า 53-60. (ภาคผนวก 2)

วีรวิทย์ ปิยะมงคล. Preimplantation Genetic Diagnosis ใน : หนังสือประกอบการประชุมวิชาการ ศ.เกียรติคุณ ดร.นพ.ปัญจะ กุลพงษ์ ประจำปี 2552 “ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา” จัดโดย คณะจารย์แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ณ ห้องบรรยาย



2 (ชั้น 12) อาคาร 12 ชั้น คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ หน้า 39-45. (ภาคผนวก 2)

**วีรวิทย์ ปิยะมงคล.** Preimplantation genetic diagnosis ใน : หนังสือประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2552 ของสมาคมอนามัยเจริญพันธุ์ (ไทย) ร่วมกับ ชมรมเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์แห่งประเทศไทย “Happy Sex and Reproduction”, 2552: 18-25. (ภาคผนวก 2)

**ภาคผนวก 1**

**Manuscript**

**FULL TITLE:**

Preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia.

**Authors:**

Wirawit Piyamongkol, MD, PhD<sup>\*</sup>; Teraporn Vutyavanich, MD, MMedSc<sup>\*</sup>; Torpong Sanguansermisri, MD<sup>\*\*</sup>.

<sup>\*</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>\*\*</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

**Correspondence to:**

Wirawit Piyamongkol, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, 110 Intawaroros Road, Sripoom, Mueang, Chiang Mai, 50200, Thailand. E-mail: wpiyamon@mail.med.cmu.ac.th, Tel. +66 5394 5553, Fax. +66 5394 6112

**Keywords:**

embryo selection, multiplex fluorescent polymerase chain reaction (PCR), preimplantation genetic diagnosis (PGD), alpha-thalassemia

### Abstract

**Objectives:** alpha-Thalassemia is the most common single gene disorder world-wide and causes significant problems in endemic area. The most severe form of alpha-thalassemia, Hb Bart's hydrops fetalis syndrome, causes serious obstetric complications which lead to maternal mortality and morbidity. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is an alternative to traditional prenatal diagnosis (PND) giving the couples at risk a chance to start a pregnancy with a disease free baby. This study aimed to develop a PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and perform clinical PGD cycles.

**Methods:** Single cell multiplex fluorescent PCR was employed for mutation analysis, contamination detection and linkage analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. A couple experienced termination of pregnancy following positive PND of alpha-thalassemia decided to join the project and two clinical PGD cycles were performed.

**Results:** A new set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation amplifying 5 fragments was designed and tested. Fourteen embryos were tested in the first PGD cycle showing two normal, five heterozygous, five affected and two with no result. One normal and two heterozygous embryos were chosen for transfer, no pregnancy was resulted. Eight embryos were analyzed in the second PGD cycle giving one normal, one heterozygous, three affected and three with no result. One heterozygous embryo was chosen for transfer on day 6, resulting in a baby boy born on the 2<sup>nd</sup> October 2008. PND confirmed heterozygous result of PGD.

**Conclusion:** Novel PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation was developed, tested and employed on two clinical PGD cycles. Clinical experience and pregnancy following PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation using multiplex fluorescent PCR protocol was reported here.

## INTRODUCTION

alpha-Thalassemia is the most common single gene disorder in the world and causes significant maternal mortality in endemic area (Weatherall, 1996). alpha-Thalassemia is more common than beta-thalassemia but is less frequently found in the hospital due to lethal feature of the most severe form (homozygous affected) which leads to intrauterine death, while carriers are generally asymptomatic and do not need much health care attention. Homozygous affected of alpha-globin gene defective leads to absence of alpha-globin chain synthesis and causes Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. Mothers carrying these fetuses are likely to develop potentially life-threatening obstetric complications, i.e. eclampsia, dystocia and obstetric hemorrhage. Therefore, the aim of prenatal diagnosis (PND) for homozygous alpha-thalassemia is to prevent serious maternal mortality and morbidity.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the genetic testing of preimplantation stage embryos for inheritable single gene defects, allowing selection of unaffected embryos prior to establishment of pregnancy (Handyside *et al.*, 1989). This gives couples the chance to start a pregnancy with a disease free baby. Consequently, the need for termination of an affected pregnancy can be eliminated. Therefore, PGD is more preferable to conventional PND.

The aim of this study was to develop a single cell PCR protocol for PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and perform clinical PGD for couples at risk.

## PATIENTS AND METHODS

### ***Patient details***

The mother and father of family 'A' were 28 and 49 years old respectively. Both of the couple carried alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and experienced one termination of pregnancy following positive PND of alpha-thalassemia. The couple were counseled regarding the project and consent were obtained. This project was approved by the Research Ethics Committee, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

### ***ICSI procedure and cleavage stage embryo biopsy***

The patients underwent routine superovulation using recombinant FSH (Puregon<sup>®</sup> Pen, Schering-Plough Organon Thailand Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and synthetic decapeptide ganirelix (Orgalutran<sup>®</sup>, Schering-Plough Organon Thailand Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and oocytes were fertilized using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). ICSI was used as a precaution to reduce the risk of sperm DNA contamination in subsequent PCR amplification. Laser biopsy was performed on Day 3 post-fertilization (4–9 cell stage), allowing two blastomeres to be removed from embryos consisting of 6<sup>+</sup> cells and one blastomere from embryos with 4–5 cells (Figure 1). Cleavage stage embryos were graded 1, 2-, 2, 2+ and 3 where grade 1 had the best morphology and grade 3 was a highly fragmented, poor quality embryo (Staessen *et al.*, 1992).

### ***Single cell isolation***

Buccal cells, isolated by micromanipulation, and biopsied blastomeres were transferred into droplets of phosphate-buffered saline (PBS) (GibcoBRL<sup>®</sup>, GibThai Co., Ltd., Chiang Mai, Thailand) with 4% bovine serum albumin (BSA) (Sigma<sup>®</sup>, S.M. Chemical Supplies Co., Ltd., Chiang Mai, Thailand) on a 5 cm Petri dish in a laminar flow cabinet. Cells were washed in a minimum of four fresh PBS droplets, while visualizing under a dissecting microscope, and were then transferred to thin-wall microcentrifuge tubes. A 2 µl aliquot of the last washing drop was also taken as a blank for each single blastomere. Cell lysis was carried out as described previously (El-Hashemite and Delhanty, 1997)

### ***Multiplex fluorescent PCR***

Extracted DNA from single cells was amplified using a combination of W1, W2, W3 and W4 primers as gap PCR for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation detection, W5 and W6 as internal control fragment of alpha-globin gene family and a microsatellite D16S475 flanking to alpha-globin gene for contamination detection and linkage analysis (Table 1) (Piyamongkol *et al.*, 2001). Multiplex fluorescent PCR was performed as previously described (Piyamongkol *et al.*, 2006). Multiplex amplified products from single cells were each tagged with different fluorochromes using labeled primers. This allowed analysis to be performed on an automated

laser fluorescent sequencer ABI Prism<sup>®</sup> 3130xl (Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand) (Hattori *et al.*, 1992).

### ***Fragment analysis***

A mixture of 1 µl fluorescent PCR products, 10 µl deionized formamide and 0.1 µl size standard (Genescan<sup>™</sup>-500 LIZ<sup>®</sup>; Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand) was prepared and denatured at 95°C for 5 min. The denatured sample was subjected to capillary electrophoresis using Performance Optimized Polymer 7 (POP-7<sup>®</sup>, Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand; 50 s injection time, 15,000 V, 60°C, 20 min) on an automated DNA sequencer ABI Prism<sup>®</sup> 3130xl (Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand). The data was analyzed by GeneMapper<sup>®</sup> software version 4.0 (Gene Systems Co., Ltd., Bangkok, Thailand).

## RESULTS

### Design of novel primers for alpha-Thalassemia<sup>-SEA</sup> analysis

New set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation analysis, including W1, W2, W3 and W4 primers were designed as gap PCR, W5 and W6 primers were employed as internal control fragment of alpha1 exon3 within alpha-globin gene family (NCBI: NG\_000006) and D16S475 (GDB: 198327) microsatellite flanking to alpha-globin gene for contamination detection and linkage analysis. In a normal genotype sample, W1-W2 primer pair amplifies 5' end breakpoint of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation and W3-W4 primer pair amplifies 3' end breakpoint of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. In a homozygous mutant genotype sample, W1-W4 primer pair amplifies deleted breakpoint of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation (Figure 2). W1, W4, W5 and D16S475 forward primers were labeled with blue (6-FAM<sup>®</sup>), green (VIC<sup>®</sup>), red (PET<sup>®</sup>) and yellow (NED<sup>®</sup>) fluorescent dyes, respectively. In a normal sample, amplification of W1-W2, W3-W4 and W5-W6 primer pairs gives rise to 288bp blue N1, 130bp green N2 and 108bp red N3 fragments of normal alpha-globin gene. In a homozygous alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion sample, W1-W4 primer pair gives rise to 217bp blue&green M1 fragment of deletion breakpoint (Figure 2).

### Preclinical assessment of methodology

From 55 single buccal cells of the couples, multiplex fluorescent PCR showed an amplification efficiency of 78.2% for N1, 96.4% for N2, 96.4% for N3 fragments giving the overall amplification efficiency of 100% for normal alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> allele and 85.5% for M1 fragment of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion allele. D16S475 showed an amplification efficiency of 90.9% with 8% allele drop out rate. The application of the protocol on 25 spare single human blastomeres donated for research showed an acceptable overall amplification efficiency of 84% for both normal alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> allele and D16S475 fragment.

### Preimplantation diagnosis results

PGD cycle 1 for family 'A' gave 14 oocytes, all were sperm injected and all 14 embryos were good quality for biopsy on day 3 post-fertilization. Mutation analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> from single biopsied blastomeres exhibited four embryos to be normal (A2, A8, A13, A14), two heterozygous (A4, A9), six affected (A5, A6, A7, A10, A11, A12) and two without result (A1, A3) (Table 2). Analysis of D16S475 fragment flanking to alpha-globin gene showed no contamination in all biopsied blastomeres. Linkage analysis of D16S475 fragment confirmed mutation analysis of two normal (A8, A13), one heterozygous (A4) and four affected embryos (A6, A7, A11, A12), while linkage analysis suggested heterozygous results in two normal (A2, A14) and one affected (A5) mutation analysis results, revealing the possibility



of ADO. One normal (A14) and two heterozygous (A4, A8) embryos were chosen for transfer on day 4, unfortunately, no pregnancy was resulted.

Ten oocytes were collected and sperm injected in PGD cycle 2 of family 'A'. Eight embryos were good enough for biopsy on day 3. Mutation analysis of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> showed one embryo to be normal (B8), one heterozygous (B2), three affected (B4, B5, B7) and three without result (B1, B3, B6). No contamination was detected. Linkage analysis results confirmed affected result in one embryo (B4). One heterozygous embryo (B2) was chosen for transfer on day 6 at blastocyst stage, one pregnancy was resulted. PND by fetal blood sampling confirmed heterozygous genotype of the fetus. A disease-free baby boy, 3,280 g, was born on 2<sup>nd</sup> October 2008.

Working up results of family 'A' confirmed heterozygous genotype of both of the parents showing 288bp blue N1, 130bp green N2 and 108bp red N3 fragments of normal allele and 217bp blue&green M1 fragment of mutant allele of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation (Figure 3 and 4). Homozygous affected genotype of their first fetus was confirmed by showing only 217bp blue&green M1 fragment of mutant allele of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation (Figure 5) without any of the normal allele. D16S475 linkage locus exhibited 164bp/170bp and 166bp/180bp alleles for the mother and the father, respectively (Figure 3 and 4). Their Hb Bart's fetus acquired 170bp and 180bp mutant linked alleles from the mother and the father, respectively (Figure 5), therefore, maternal 164bp allele and paternal 166bp allele should be linked to the normal allele. Multiplex fluorescent PCR on normal control sample from an unrelated subject gave only 288bp blue N1, 130bp green N2 and 108bp red N3 of normal allele (Figure 6). Subsequent PGD analysis of blastomere A4.1 demonstrated heterozygous genotype with 164bp normal linked allele and 180bp mutant linked allele from the mother and the father, respectively (Figure 7). Normal genotype blastomere A8.2 showed 164bp and 166bp normal linked allele from both of the parents (Figure 8).

Summarizing the data of a total of 36 single biopsied blastomeres from 2 clinical PGD cycles gave amplification efficiency of 72.2% (26/36) and 63.8% (23/36), ADO rates of 19.2% (5/26) and 30.4% (7/23) for alpha-globin gene and D16S475 locus, respectively. Follow-up analyses were performed on the untransferred embryos. For this purpose whole embryos were transferred to PCR tubes and subjected to the same protocol as used for the actual PGD. The initial diagnosis was confirmed in all cases. No contamination was detected. A total of 24 embryos, including untransferred embryos and two arrested embryos (B9 and B10), in this study (Table 2) revealed 5 normal, 11 heterozygous and 8 affected embryos.

## DISCUSSION

Homozygous genotype of alpha-thalassemia causes severe anemia which leads to high output heart failure and hydrops fetalis syndrome in utero. Fetal hydropic phenotype always causes serious maternal complications. Prior to the era of heterozygotes screening and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia, several mothers to such homozygous alpha-thalassemia fetuses in Thailand died from eclampsia or hemorrhage every year. The introduction of prenatal control of severe thalassemia: Chiang Mai strategy (Tongsong *et al.*, 2000) helps in early detection of homozygous alpha-thalassemia fetuses and termination of pregnancy before maternal complications begin, eliminating maternal death. Application of PGD provides the advantage over traditional PND in avoiding termination of affected pregnancy and its complications. PGD of alpha-thalassemia should be demanding, but there have not been many reports on it (Wells and Delhanty, 2001).

In this study, a new set of primers was developed and tested as gap PCR for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> and was employed in clinical PGD. In addition, Primers amplifying an internal control of normal fragment within alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion were included in the protocol. A microsatellite marker flanking to alpha-globin gene family was also included for contamination detection and back up linkage analysis results. In the final PGD protocol, multiplex fluorescent PCR using 4 sets of primers amplifying 5 fragments was successfully done on heterozygote single cells. Preclinical workup of novel PGD protocol on single buccal cells and single spared blastomeres gave acceptable amplification efficiency and ADO.

Comparing with previously designed primers for gap PCR (Ko *et al.*, 1992) which amplify 5' end breakpoint of normal allele and mutant allele, new protocol in this study amplify both 5' end and 3' end breakpoint of normal allele and mutant allele with different annealing sites. In addition, internal control fragment within the breakpoint is also employed. Therefore, novel protocol in this study amplifies three fragments of the normal allele. Traditional primers amplify one fragment for each of normal and mutant alleles, in case of polymorphism of alpha-globin gene sequences which causes amplification failure of either normal or mutant alleles would lead to misdiagnosis. Results of one of the three fragments of normal allele can rescue diagnosis results of the single blastomere in case of ADO of the second or third primers for normal allele (Piyamongkol *et al.*, 2003) as demonstrated in the preclinical workup results in this study that amplification efficiency for normal alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> allele using this new set of primers reached 100%. Detecting normal allele is crucial for diagnosis of normal and heterozygous genotypes in autosomal recessive disorders. Moreover, a polymorphic marker next to the breakpoint is also included for backup linkage analysis results as a fourth fail proof diagnostic clue.

Preliminary 14 embryos in the first PGD cycle were enough for selection. Only 2 embryos with poor quality on day 3 failed to give analysis results, diagnosis could be drawn from 12 embryos. However, all embryos with best quality (Grade 1) either were affected (embryos A6, A7, A10 and A11) or arrested on day 4 (embryo A9). Three un-affected embryos (embryos A4, A8 and A14) chosen for transfer were of poorer quality on day 3. Although, these embryos developed well on day 4 into morula and blastocyst stage, none implanted.

There were 8 embryos for biopsy at the beginning of the second PGD cycle, only 6 (embryos B1, B2, B3, B4, B5 and B7) were with 6-8 cells. Three (embryos B1, B3 and B6) failed to give diagnosis result, probably due to the poor quality of the biopsied blastomeres. Moreover, affected result was concluded in three embryos (embryos B4, B5 and B7). Therefore, there were not many choices of un-affected embryos with good quality for transfer. From three embryos with best morphology, two (embryos B4 and B5) were affected while the third (embryo B2) was heterozygous. Luckily the heterozygous embryo with best quality (embryo B2) developed very well after biopsy, was chosen for transfer and gave rise to a healthy pregnancy.

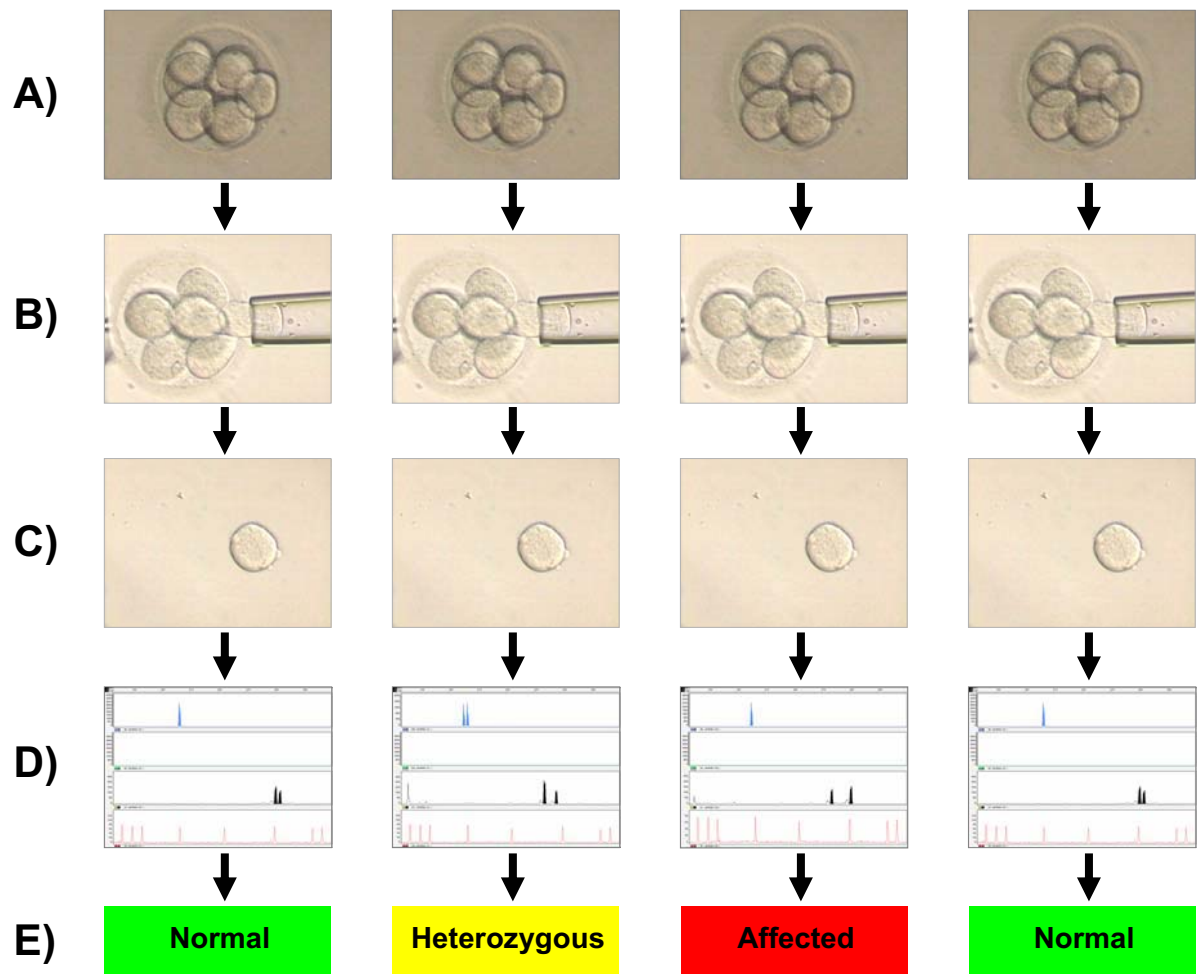
From 22 embryos in two clinical PGD cycles (Table 2), mutation analysis demonstrated 5 normal, 3 heterozygous, 9 affected and 5 without result. In addition to showing no contamination in all single blastomeres, linkage analysis results using D16S475 locus confirmed mutation analysis results in two normal, one heterozygous and 5 affected embryos, while suggested two normal and one affected results to be heterozygous embryos indicating ADO of those blastomeres. This demonstrated the benefit of the incorporating D16S475 analysis for back up linkage analysis results in addition to contamination detection purpose. Confirmation analysis of untransferred embryos revealed the overall genotyping distribution to be 5 (20.8%) normal, 11 (45.8%) heterozygous and 8 (33.4%) affected. As expected, ADO made heterozygotes ratio lower than actual prevalence while normal and homozygous affected ratio higher than actual. This event would not lead to misdiagnosis, but a reduced number of heterozygous embryos for transfer, subsequently, possibly a lower pregnancy rate. There is a notice that ADO problem did not deteriorate the accuracy of diagnosis in this study because of the fail proof design of PCR protocol.

In conclusion, novel PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> using multiplex fluorescent single cell PCR was developed, tested and clinically applied in two PGD cycles. New set of primers for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation was designed for detecting three fragments of the normal allele and one fragment of the mutant allele as a fail proof technique. In addition, a microsatellite next to alpha-globin gene was included for contamination detection and backup linkage analysis information. This multiplex gap PCR protocol can be useful for PGD as well as PND. First birth following PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> in Thailand was reported here.

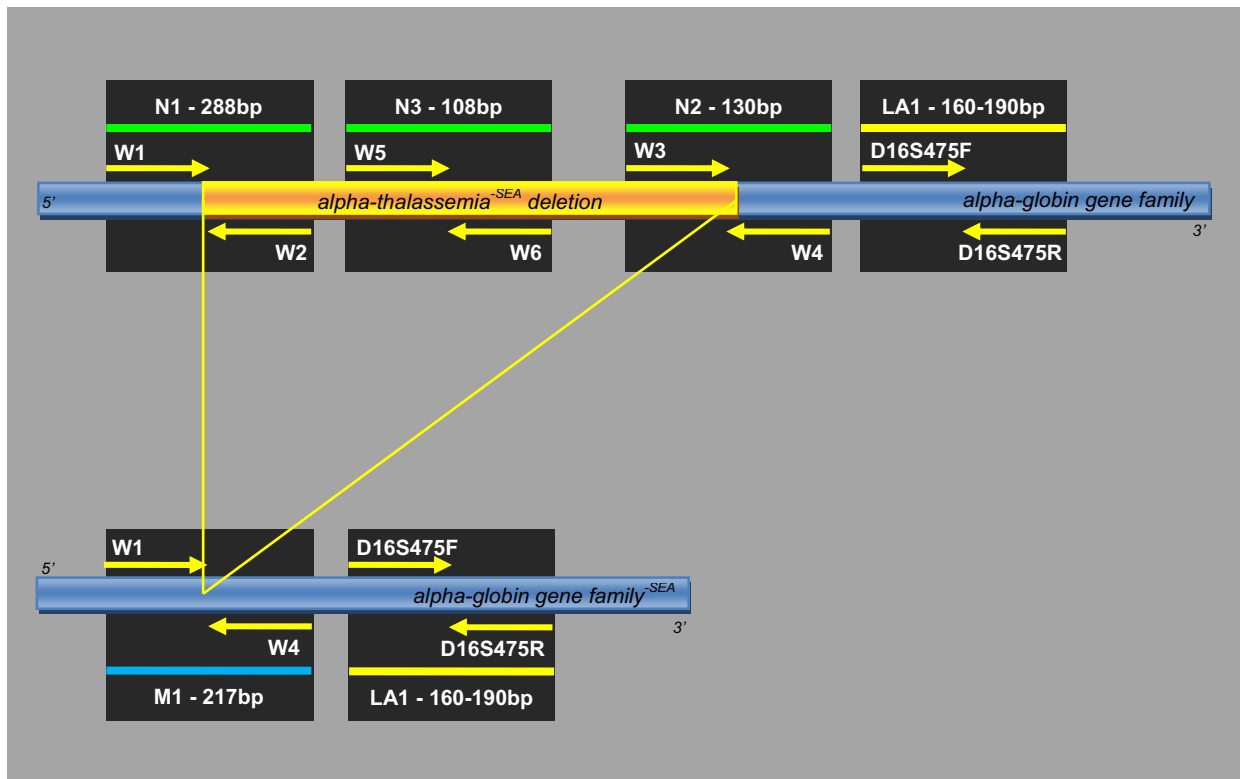
**ACKNOWLEDGEMENTS**

This project was supported by the National Research Council of Thailand, the Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education (grant no. MRG4980077) and Eisai (Thailand) Co., Ltd. Ovarian induction drugs were sponsored by Schering-Plough Organon (Thailand) Co., Ltd.

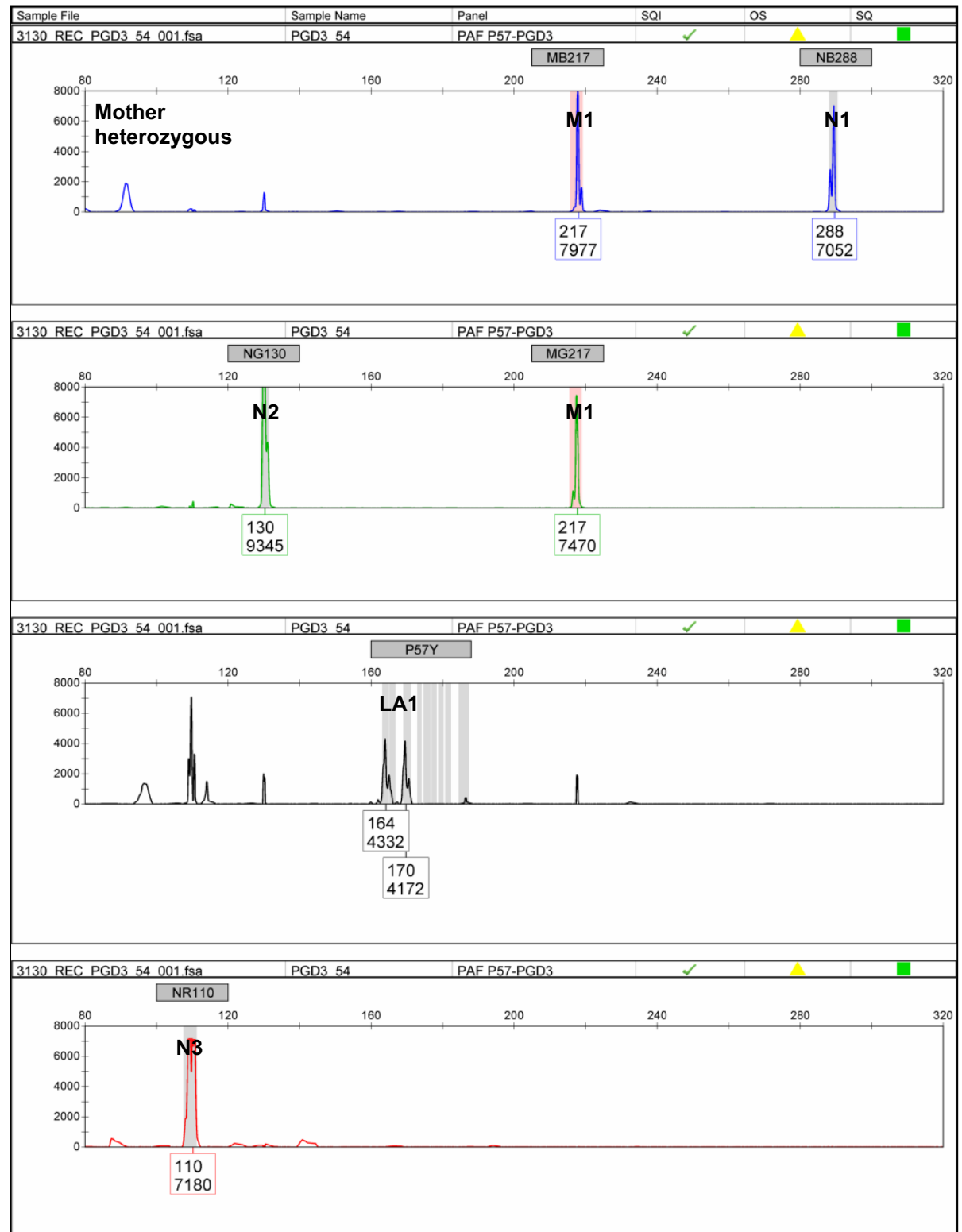
**Figure 1** Preimplantation genetic diagnosis (PGD) or embryo selection of alpha-thalassemia: A) Day 3 cleavage stage embryos from in vitro fertilization (IVF), B) a blastomere is taken from an embryo using a micromanipulator, C) single blastomere from each embryo for DNA analysis, D) DNA analysis results from multiplex fluorescent single cell PCR, E) Unaffected embryos are chosen for transfer. IVF and Embryo biopsy procedures was performed by TV, single cell PCR was performed by WP.



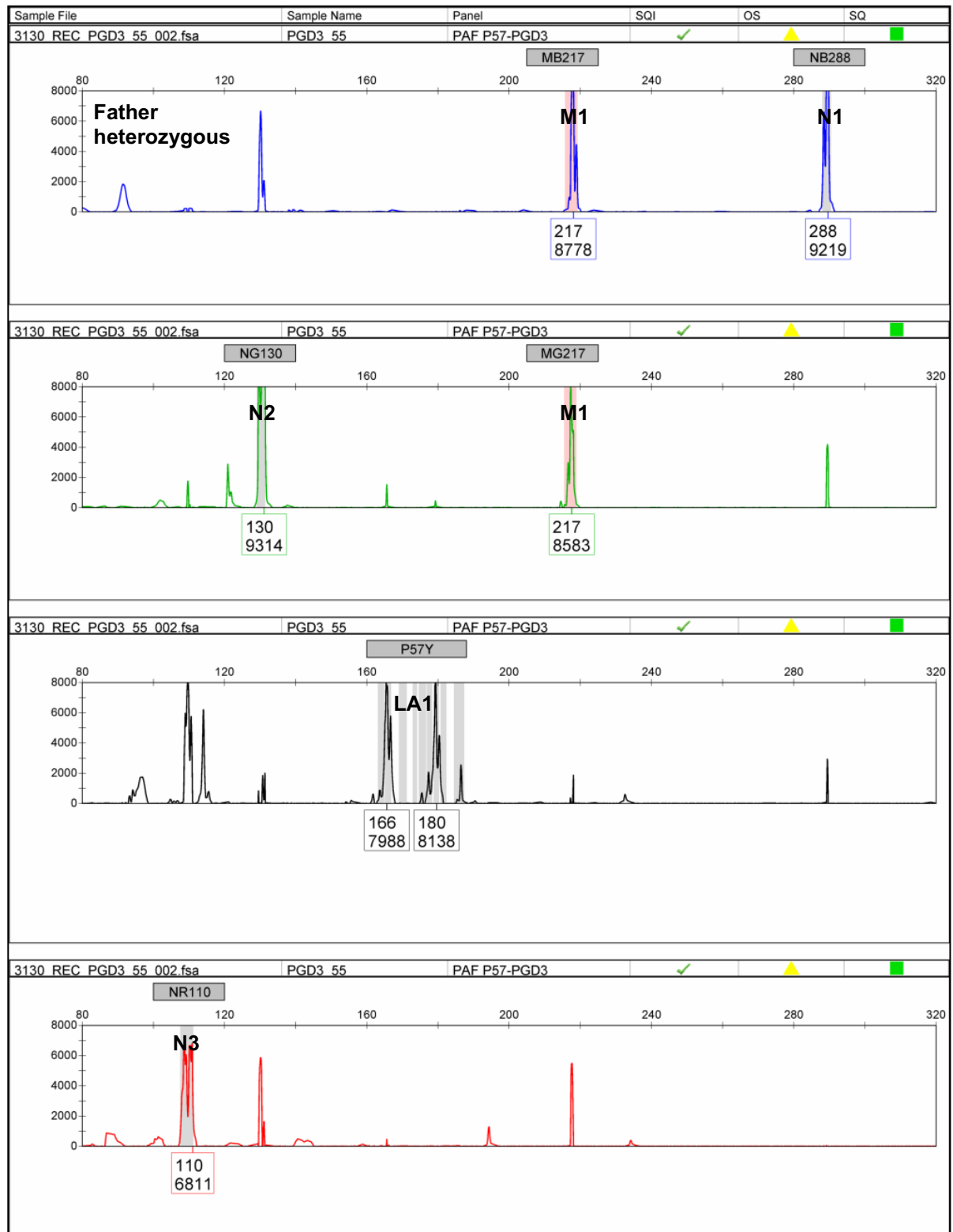
**Figure 2** Diagram showing alpha-globin gene family and alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> deletion with primers map.



**Figure 3** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Heterozygous sample of mother of family 'A' with positive normal (blue-N1, green-N2, red-N3) and mutant (blue&green-M1) fragments is shown. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene.

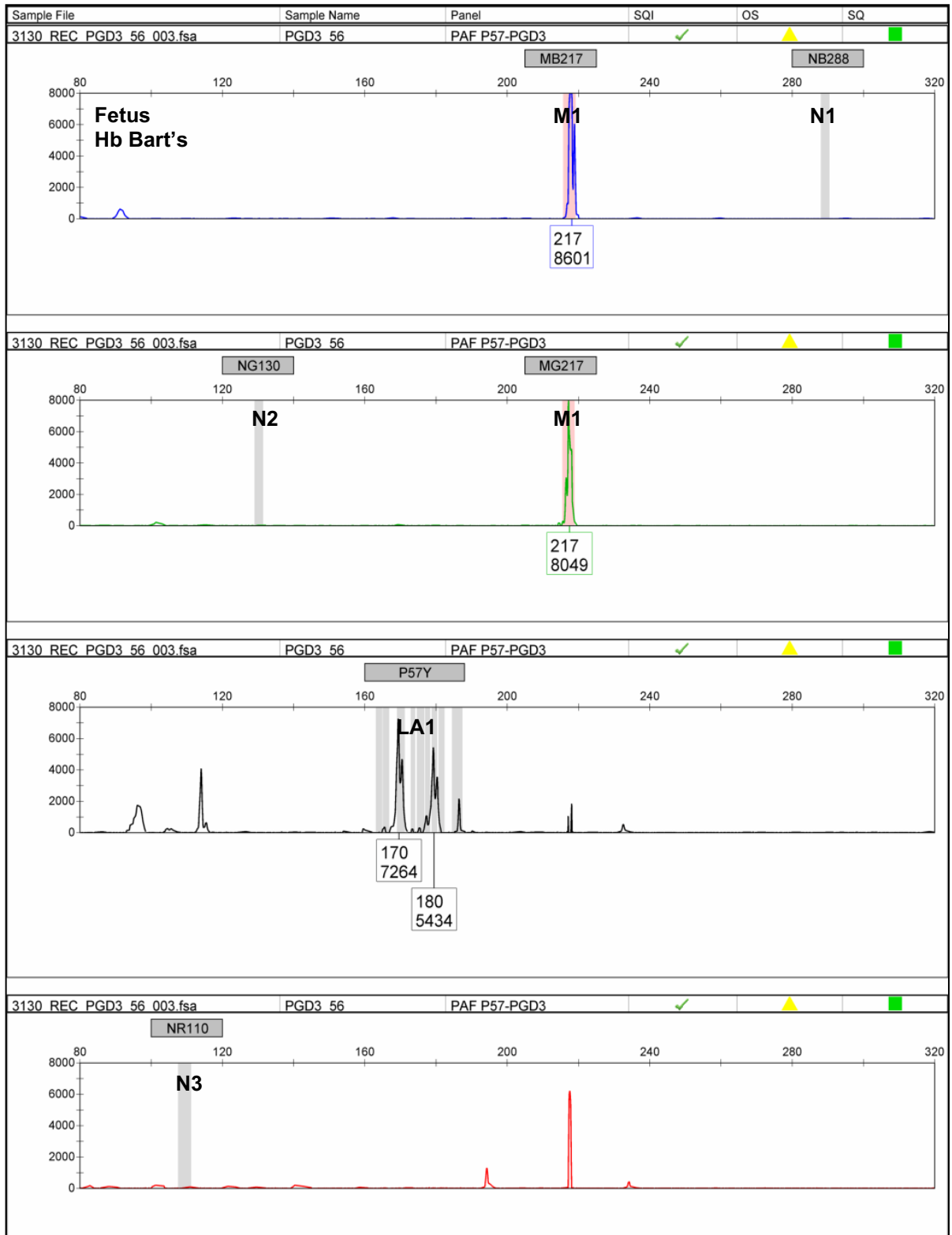


**Figure 4** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Heterozygous sample of father of family 'A' with positive normal (blue-N1, green-N2, red-N3) and mutant (blue&green-M1) fragments is shown. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene.

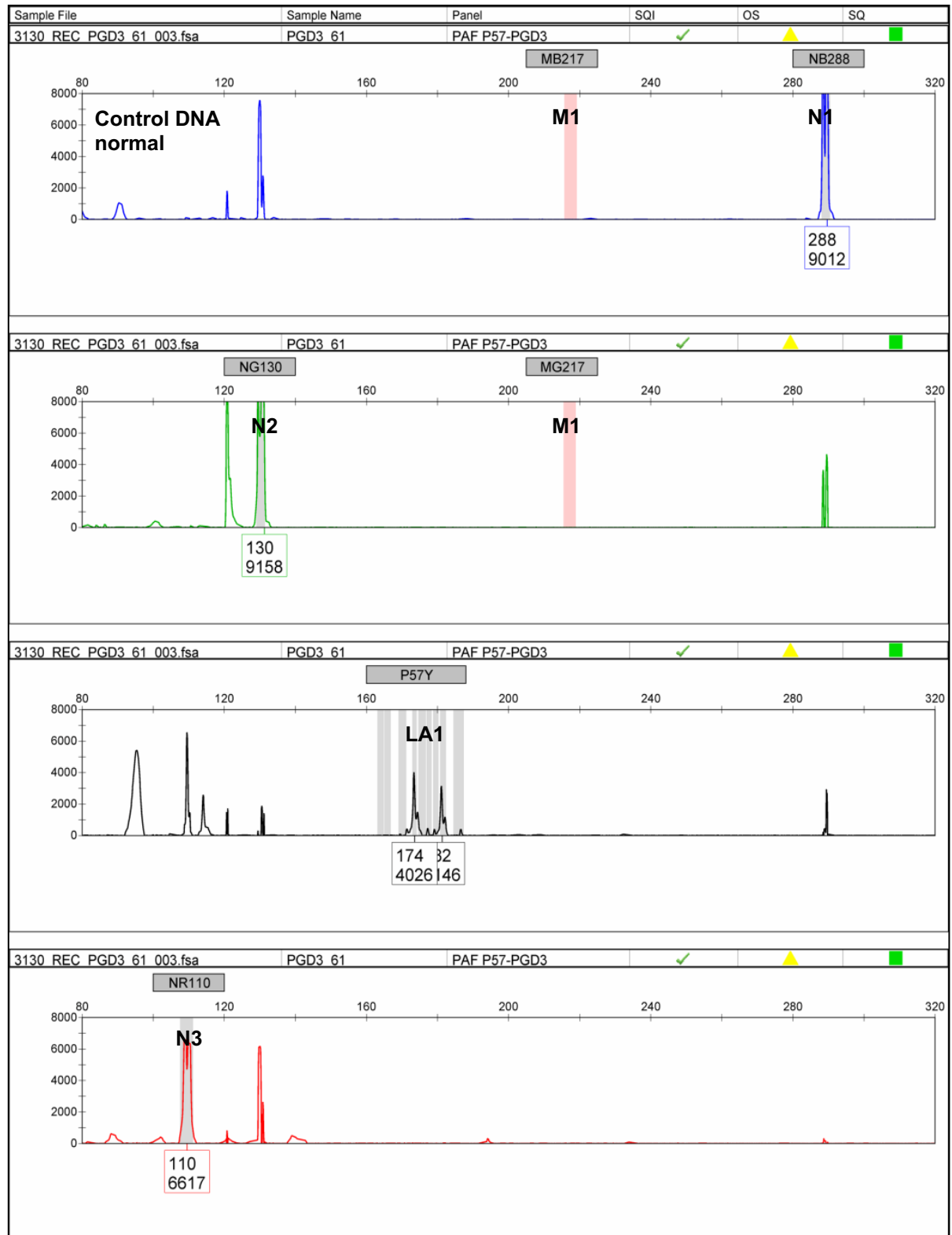




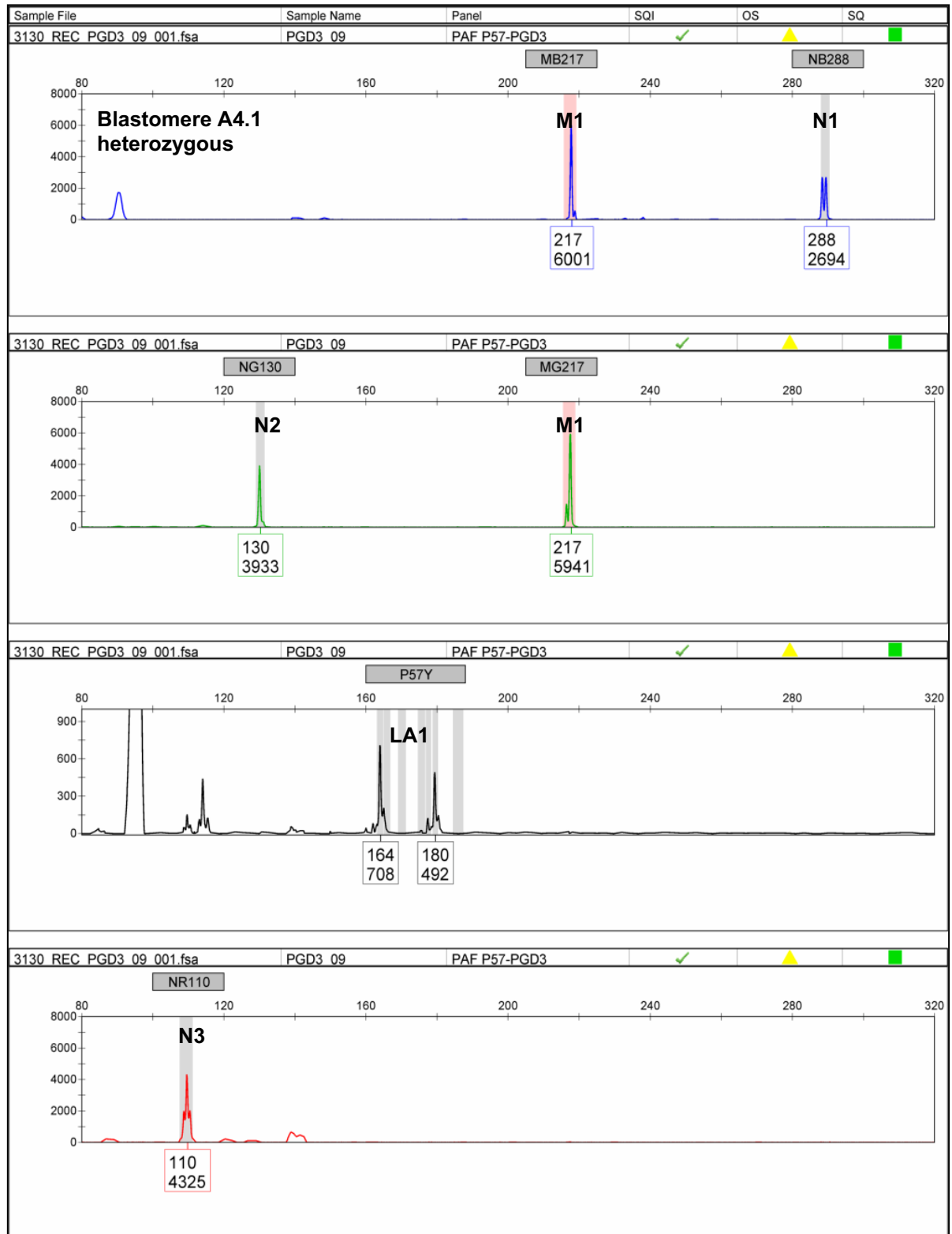
**Figure 5** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Homozygous affected sample of Hb Bart's fetus of the couple 'A' with positive only mutant (blue&green-M1) fragment is demonstrated. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene, 170bp and 180bp alleles are linked to mutant allele of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation in this family.



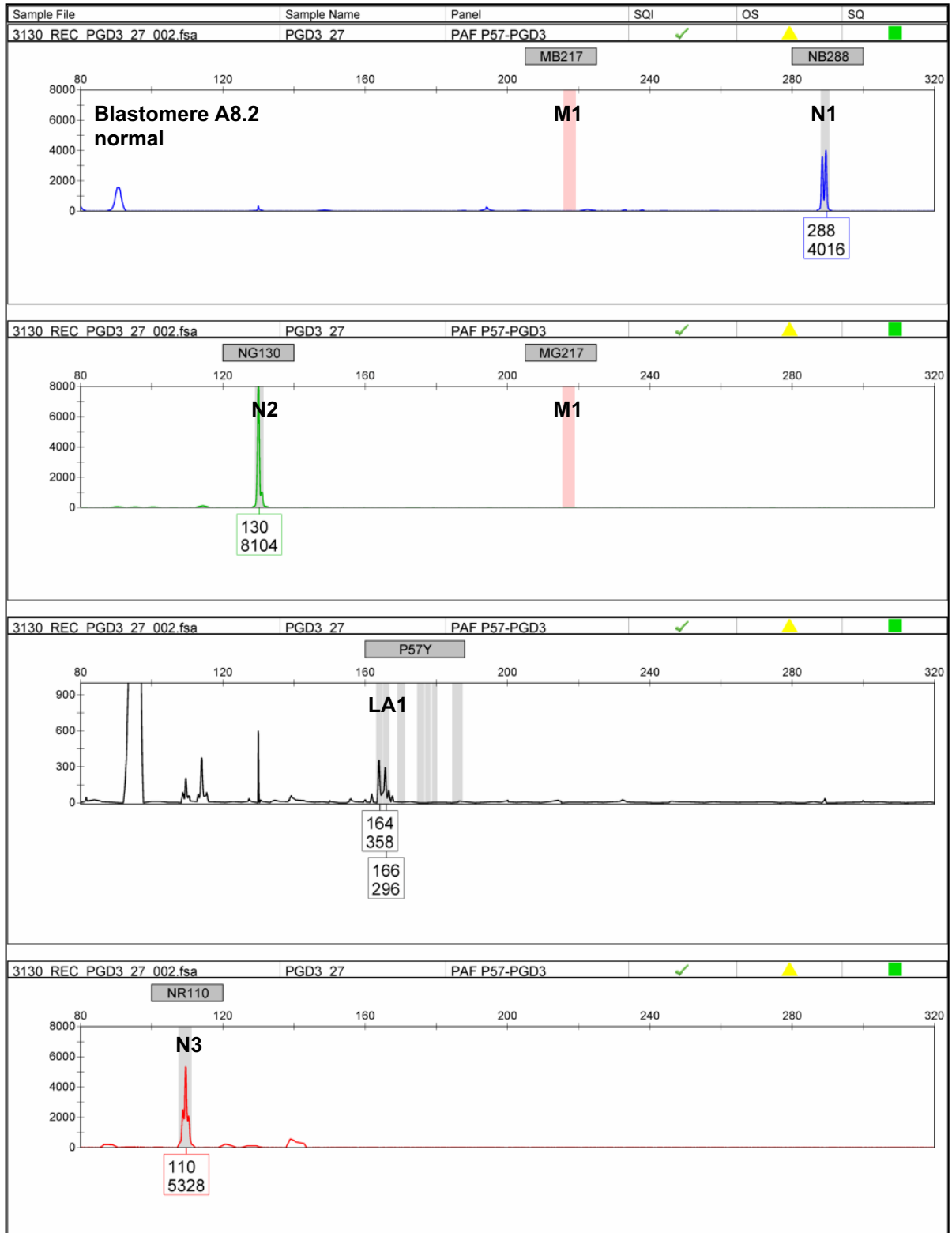
**Figure 6** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Normal control sample with positive only normal (blue-N1, green-N2, red-N3) fragments is demonstrated.



**Figure 7** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper® on an automated DNA sequencer ABI Prism® 3130xl for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Heterozygous single biopsied blastomere from clinical PGD for family 'A' with positive normal (blue-N1, green-N2, red-N3) and mutant (blue&green-M1) fragments is shown.



**Figure 8** Multiplex fluorescent PCR results from GeneMapper<sup>®</sup> on an automated DNA sequencer ABI Prism<sup>®</sup> 3130x/ for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Normal single biopsied blastomere from clinical PGD for family 'A' with positive only normal (blue-N1, green-N2, red-N3) fragments is shown. Yellow/black-LA1 fragment is D16S475 microsatellite marker flanking to alpha-globin gene.



**Table 1** Details of primers for alpha-thalassemia-SEA mutation analysis.

Primers	Sequences	Labeling dye	References
W1	5'-GAA GGA GGG GAG AAG CTG AG-3'	FAM-B	NCBI: NG_000006
W2	5'-TGT GGA AAA GTT CCC TGA GC-3'	-	
W3	5'-TGC ACA CCT ATG TCC CAG TT-3'	-	
W4	5'-TTG AGA CGA TGC TTG CTT TG-3'	VIC-G	
W5	5'-GCC ACT GCC TGC TGG TG-3'	PET-R	NCBI: NG_000006
W6	5'-AGG TCA GCA CGG TGC TCA C-3'	-	
D16S475F	5'-AGG GGT TGA CAG AGT GAG ACT CC-3'	NED-Y	GDB: 198327
D16S475R	5'-CAG GAA CAG AAA ATA CTG CAC GG-3'	-	

**Table 2** Preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassaemia<sup>-SEA</sup> mutation results of family 'A', cycle 1 (embryos A1-A14) and cycle 2 (embryos B1-B9).

Embryo no.	Embryo grade (no. of cells) before biopsy (Day 3)	Cells taken (n)	Cell no.	alpha-Thal <sup>-SEA</sup> results	Microsatellite linked marker (D16S475) results	Diagnosis	Outcomes	Confirmation results
A1	2 <sup>+</sup> (8)	2	A1.1 A1.2	No result Lysed	No result	No result	Untransferred	Ht <sup>**</sup>
A2	3 (6)	2	A2.1 A2.2	Normal Lysed	NC <sup>***</sup> , suggestive of Ht	Normal or Ht	Untransferred (arrested)	Ht
A3	3 (8)	2	A3.1 A3.2	No result No result	No result	No result	Untransferred	Ht
A4	2 <sup>+</sup> (9)	2	A4.1 A4.2	Ht Ht	NC, suggestive of Ht NC, suggestive of Ht	Ht	ET <sup>****</sup> (early blastocyst)	-
A5	2 (7)	2	A5.1 A5.2	Affected No result	NC, suggestive of Ht No result	Affected or Ht	Untransferred	Ht
A6	1 (8)	2	A6.1 A6.2	Affected Affected	NC, suggestive of Affected NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
A7	1 (8)	2	A7.1 A7.2	Affected Affected	No result NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
A8	3 (8)	2	A8.1 A8.2	Normal Normal	NC, suggestive of Normal NC, suggestive of Normal	Normal	ET (morula)	-
A9	1 (7)	2	A9.1 A9.2	Ht Ht	No result Allele drop-out	Ht,	Untransferred	Ht
A10	1 (8)	2	A10.1 A10.1	Affected No result	No result Allele drop-out	Affected	Untransferred	Affected
A11	1 (8)	2	A11.1 A11.2	Affected No result	NC, suggestive of Affected Allele drop-out	Affected	Untransferred	Affected
A12	2 <sup>+</sup> (7)	2	A12.1 A12.2	Affected Affected	NC, suggestive of Affected NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
A13	2 <sup>+</sup> (7)	2	A13.1 A13.2	Normal Normal	Allele drop-out NC, suggestive of Normal	Normal	Untransferred (arrested)	Normal
A14	2 <sup>+</sup> (9)	2	A14.1 A14.2	Normal Normal	No result NC, suggestive of Ht	Normal or Ht	ET (early blastocyst)	-
B1	2 <sup>+</sup> (8)	2	B1.1 B1.2	No result No result	No result	No result	Untransferred	Normal
B2	1 (8)	2	B2.1 B2.2	Ht Ht	Allele drop-out Allele drop-out	Ht	ET (blastocyst)	Ht (PND)
B3	2 <sup>+</sup> (7)	2	B3.1 B3.2	No result Lysed	No result	No result	Untransferred	Normal
B4	1(7)	2	B4.1 B4.2	Affected Lysed	NC, suggestive of Affected	Affected	Untransferred	Affected
B5	1(7)	2	B5.1 B5.2	Affected Lysed	Allele drop-out	Affected	Untransferred	Affected
B6	2 <sup>+</sup> (5)	1	B6.1	No result	No result	No result	Untransferred	Normal
B7	1(6)	1	B7.1	Affected	No result	Affected	Untransferred	Affected
B8	1(5)	1	B8.1	Normal	No result	Normal	Untransferred	Ht
B9	1(4)	0	-	-	-	-	Untransferred	Ht
B10	1(4)	0	-	-	-	-	Untransferred	Ht

\* Embryos were graded 1, 2<sup>+</sup>, 2, 2<sup>+</sup> and 3 where grade 1 had the best morphology and grade 3 was a highly fragmented, poor quality embryo

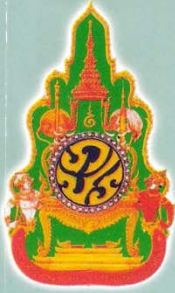
\*\* Ht = Heterozygous

\*\*\* NC = No contamination detected

\*\*\*\* ET = Embryo transferred

## ภาคผนวก 2

### การประชุมวิชาการ หนังสือและตำรา



# JOURNAL OF THE MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND

จดหมายเหตทางแพทย  
แพทยสมาคมแห่งประเทศไทย  
ในพระบรมราชูปถัมภ์

*To Commemorate the Auspicious Occasion of the 60th Anniversary Celebration of His Majesty King Bhumibol Adulyadej's Accession to the Throne*



*The 21st Scientific Congress of RCOG  
and the Second Collaboration with RANZCOG*

*The Royal Thai College of Obstetricians and  
Gynaecologists  
The Royal Australian and New Zealand College of  
Obstetricians and Gynaecologists*

*Challenges in Reproductive Health for  
Thailand in the Next Decade*

*October 24-27, 2006*

*Ambassador City Jomtien Hotel & Resort,  
Pattaya City, Chonburi Province, THAILAND*

**Volume 89**

**Suppl. 4**

**OCTOBER 2006**

**ISSN 0125 - 2208**

**THE OFFICIAL JOURNAL  
OF**

**THE MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND  
THE ROYAL THAI COLLEGE OF OBSTETRICIANS  
AND GYNAECOLOGISTS  
THE ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS OF THAILAND  
INSTITUTE OF MEDICINE, SURANAREE UNIVERSITY  
OF TECHNOLOGY**





## Special Article

# Role of Molecular Biology in Obstetrics – Modern Single Gene Disorders Diagnosis Techniques

Wirawit Piyamongkol MD, PhD, FRTCOG\*

\* Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai

Single gene mutations may lead to an inherited disorder with Mendelian inheritance patterns, of which over 8,000 disorders have been catalogued. The strategy of population screening, offering genetic counseling, prenatal diagnosis and termination of affected pregnancy has been successfully applied worldwide to reduce the number of new patients. Common fetal sampling techniques in utero include chorionic villous sampling, amniocentesis, and fetal blood sampling. Then appropriate analysis is applied for diagnosis, where karyotyping is mainly for chromosome abnormalities and PCR is for single gene disorders. Several modern molecular techniques are useful for identification of defects in single genes. Preimplantation genetic diagnosis is an advanced alternative giving the couple the chance to start a pregnancy ensuring that the baby is free from the genetic disease. It is the role of obstetricians to make most use of the advance molecular biology knowledge to have a healthy community.

**Keywords:** Chromosome abnormalities, Down's syndrome, Embryo selection, Molecular biology, Polymerase chain reaction (PCR), Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Prenatal diagnosis (PND)

*J Med Assoc Thai 2006; 89 (Suppl 4): S186-91*

**Full text. e-Journal:** <http://www.medassocthai.org/journal>

Mutations in single genes can lead to inherited disorders with Mendelian inheritance patterns. Individual single gene disorders are rare, but together affect around 1% of the general population. More than 8,000 different single gene disorders have been catalogued to date ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/), 2006) and can be categorized by their inheritance patterns as autosomal dominant (over 3,400 disorders), autosomal recessive (over 3,200 disorders), and sex-linked disorders (over 1,300 disorders). Common fetal sample collection techniques and the role of molecular biology in Obstetrics, in particular the aspect of modern techniques for single gene disorders diagnosis, are discussed in this article.

### Diagnosis of genetic diseases

Couples who are affected or who carry a genetic defect possess a high risk of passing on the abnormality to their children. Prior to the era of prenatal diagnosis (PND), such subjects had to decide whether

to be childless or risk having children who might inherit the genetic disorder. With the evolution of molecular genetic technologies, the testing of the growing number of inherited genetic diseases has become feasible. In addition to the correlation of the particular gene defect to each disorder, such tests are notably useful in identifying asymptomatic carriers who are at risk of transmitting the genetic abnormality to their offspring. This knowledge, when incorporated with genetic counseling and appropriate prenatal diagnosis techniques, helps in reducing the number of the births of new affected cases<sup>(1,2)</sup>.

Mutation analysis can be performed directly if the responsible genes in the family have been identified and cloned. However, in cases where the causative mutations are still unspecified or direct analysis techniques are unavailable, the examination of polymorphic loci adjacent to the causative mutation can be employed for linkage analysis in order to track down the transmission of the mutant gene in the family. The polymorphic linked markers with point variation can be identified using restriction fragment length polymorphisms (RFLP), while those with hypervariable micro-

Correspondence to : Piyamongkol W, Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

satellite loci, which give more alleles with varied size, are more useful.

### **Prenatal diagnosis**

The combination of molecular techniques for diagnoses of genetic diseases and procedures to collect fetal cells in utero enables prenatal diagnosis of many genetic disorders at an early stage of pregnancy. Normal testing results reassure the parents that their fetus is free from the disease; while abnormal results give them a chance of deciding to discontinue the pregnancy, to have fetal therapy where possible, or to continue the pregnancy.

### **Amniocentesis**

Amniocentesis is the commonest invasive procedure for prenatal diagnosis. Amniocentesis is usually performed at 15 weeks of pregnancy or over. Karyotyping is standard method for diagnosis of chromosome abnormalities, i.e. Down syndrome. However, modern analysis methods, including FISH<sup>(3)</sup> and polymerase chain reaction (PCR)<sup>(4)</sup> on uncultured amniocytes have become popular alternatives to accelerate diagnosis reports. The application of amniocentesis for single gene disorders is less common due to high risk of maternal cells contamination.

### **Chorionic villus sampling (CVS)**

Chorionic villus sampling (CVS) is a technique to retrieve fetal tissue for analysis in the first trimester. The major advantage of this technique includes the opportunity to obtain sufficient fetal cells for the tests and early fetal diagnosis results that enable first trimester abortion in cases of affected fetuses. Moreover, direct DNA analysis, fast karyotyping following a rapid culture technique and biochemical analysis from the biopsied chorionic villus are also possible. The event called confined placental mosaicism (CPM) can be found in approximately 1% of pregnancies and can lead to discordant results between the CVS and the fetus<sup>(5)</sup>. Therefore, confirmatory amniocentesis or fetal blood sampling are required in some cases to confirm CVS results.

### **Fetal blood sampling (FBS)**

Fetal blood sampling from the umbilical cord or cordocentesis was preliminary performed using a fetoscopic technique<sup>(6)</sup>. However, this technique has been superseded by the percutaneous ultrasound guided approach<sup>(7)</sup> when high resolution ultrasound was developed. Fetal blood samples are useful for di-

agnosis of thalassemias, hematologic disorders, quick karyotyping, fetal isoimmunisation, hypoxia, infection, metabolic disorders, and single gene defects.

### **Preimplantation genetic diagnosis (PGD)**

At present the strategy of population screening, genetic screening and offering appropriate prenatal diagnosis procedures is the best tool to control the incidence of new cases with genetic disorders in many countries. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the genetic testing of preimplantation stage embryos for inheritable chromosome abnormalities or single gene defects<sup>(8)</sup>. This allows the selection of unaffected embryos prior to the establishment of a pregnancy, and therefore gives the couple the chance to start a pregnancy with a disease free baby. Consequently, the need for termination of an affected pregnancy can be eliminated. The first PGD baby in Thailand was born in June 2005 at Chiang Mai University Hospital<sup>(9)</sup>.

### **Modern molecular biology techniques**

#### **Fluorescent PCR (F-PCR)**

The traditional methods of visualizing the PCR products following electrophoresis include ethidium bromide or silver staining or the use of radioactive labeled primers. The introduction of F PCR<sup>(10)</sup> has been useful for DNA analysis, increasing the sensitivity and specificity. The application of oligonucleotide primers attached to fluorescent molecules gives rise to amplified products labeled with fluorescent dye. When these F PCR products migrate under electrophoresis to the position where the laser bisects the gel, the fluorescent molecules are activated by the laser and give a signal with a specific wavelength that can be detected by a CCD (charged couple device) detector and analyzed by computer software. This technique allows the size standards to run in the same lane, consequently, the size analysis is as precise as a single base pair difference.

#### **Multiplex PCR**

Multiplex PCR is a technique allowing more than one locus to be amplified by using a combination of unrelated sets of primers in a PCR tube<sup>(11)</sup>. The PCR products of different loci can be distinguished by designing the primers to generate amplified fragments with different sizes. This strategy benefits the analysis of multiple loci, i.e. the detection of more than one disease or the combination of mutation detection and a linked or unlinked polymorphic locus without increasing time and cost. The additional information of an



informative polymorphic marker is useful for a back up linkage analysis result (for a linked marker only) and contamination identification<sup>(12)</sup>.

#### **Modern mutation analysis methods**

The amplified products with size differences can be analyzed using traditional agarose gel, polyacrylamide gel electrophoresis or F PCR. However, base pair substitutions without size alteration, or small deletions or insertions are more difficult to detect. For substitution mutations, major detection systems include those for a particular mutation and those that can identify several mutations at a time. Scanning methods are helpful for searching for uncharacterized mutations and for diseases that are caused by a variety of mutations, i.e. beta thalassemia. Popular techniques of this group include heteroduplex analysis (HA), single strand conformational polymorphism (SSCP) and denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE). Mutation specific analysis techniques are useful for detecting common mutations and provide definite results. These techniques include restriction fragment length polymorphism (RFLP) and amplification refractory mutation system (ARMS).

#### **Restriction fragment length polymorphism (RFLP)**

RFLP is a mutation specific analysis technique. The analysis is based on the identification of the difference of the DNA sequence, i.e. mutation, by digestion of the DNA using restriction endonucleases. The bacterial enzymes can recognize a particular DNA sequence and cleave the DNA strand at the recognition site. By knowing the DNA sequence, a specific restriction enzyme can be used to digest either the normal or the mutant sites giving a size difference between both alleles<sup>(13)</sup>. An artificial restriction site can be created using a primer of modified sequence as site specific mutagenesis (SSM) method if there is no natural one<sup>(14)</sup>.

#### **Dot-blot and reverse dot-blot hybridization**

Allele specific oligonucleotide probes can be used for specific mutation detection from uncultured amniocytes or chorionic villous samples as dot-blot and reverse dot-blot hybridization<sup>(15)</sup>. The disadvantage with these methods is that a particular allele-specific oligonucleotide (ASO) probe can hybridize with only one mutation in the analysis.

#### **Amplification refractory mutation system (ARMS)**

ARMS is another mutation specific analysis

method. This technique involves the annealing of allele-specific oligonucleotides and the use of three oligonucleotides: one for the common upstream sequences and two for the normal and mutant sequences. The allele-specific oligonucleotides in this method function as primers for PCR. Successful amplification of the DNA being tested indicates that the specific normal/mutant primer has annealed, and thus confirms the presence of the specific normal/mutant alleles. Primers for the normal and mutant alleles can be included in the same PCR tube and designed to have size difference or be labeled with different fluorescent dyes in order to differentiate both alleles<sup>(16)</sup>.

#### **Heteroduplex analysis (HA)**

When denatured and allowed to reanneal, the complementary strands of the normal and mutant alleles of a heterozygote sample will form hybrid molecules (heteroduplex) with an area of mismatch of the different sequence. The heteroduplex molecules will give extra bands during the electrophoresis due to their different migration pattern from the homoduplex molecules. Samples with homozygous genotypes do not generate an extra heteroduplex band, unless the PCR product of the different homozygous genotype is added<sup>(17)</sup>.

#### **Single strand conformational polymorphism (SSCP)**

SSCP analysis is a scanning technique relying on the electrophoretic resolution of the sequence specific conformations of single stranded DNA fragments<sup>(18)</sup>. This strategy is useful in detecting small deletions and insertions and single base pair substitutions of the fragment size from 100 to 500bp. A single base pair mutation can give rise to a markedly different single strand conformation, which results in a different migration rate during the electrophoresis, and therefore the different alleles can be identified. By this method, multiple mutations that lie within the same amplified fragment can be identified using a single protocol. This can benefit the diagnosis of compound heterozygous genotypes.

#### **Denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE)**

The related strategy to SSCP, DGGE is based on the altered melting characteristics due to sequence difference that influence migration rates during the electrophoresis through a polyacrylamide gel with an increasing concentration of denaturant. The test fragments in this method are usually amplified using specially designed primers with a stretch of approximately 40 guanine or cytosine residues (GC clamp)<sup>(19)</sup>.

### Advanced molecular analysis techniques

#### Sequencing

The use of a modern automated laser fluorescence DNA sequencer that can visualize up to four fluorescent dyes allows the sequencing reaction to be accomplished within a single tube and the sequencing product to be analyzed on a single lane. These methods allow the detection of virtually any mutation, with little or no adjustment of methodology. Theoretically, sequencing should be particularly useful in cases of disease caused by a heterogeneous spectrum of mutations, as it will often be possible to design a single set of primers that allows the detection of multiple affected genotypes, in particular beta-thalassemias<sup>(20)</sup>.

#### Mini-sequencing

The minisequencing technique employs the same strategy as the standard fluorescent sequencing, but extends only one nucleotide after the minisequencing primer. This gives rise to a shorter fragment size and consequently a faster analysis time for the electrophoresis. Both techniques are useful for the detection of single nucleotide substitutions, deletions, and insertions. A particular minisequencing primer, which locates just before the mutation, is used for each specific mutation. By changing the primers used in the PCR step and minisequencing primers, this protocol can be used as a versatile analysis protocol<sup>(20)</sup>.

#### Contamination problem

In PND, contamination is a major problem. PCR set up in a DNA-free environment away from the analysis area can help in reducing the chance of getting 'carry over' PCR products from previous amplifications. All media and reagents should be tested regularly. Despite all efforts, contamination can still occasionally take place and cause misdiagnosis. Maternal DNA contamination is most crucial and difficult to prevent. For a dominant disease, if the mother carries the causative gene, maternal DNA contamination would lead to an affected result and consequently termination of a normal baby. In case of a recessive disease, the contamination of maternal heterozygote DNA in a homozygote affected sample would lead to a heterozygote result, and continuing the affected pregnancy. In order to reduce the risk of misdiagnosis caused by contamination, the concept of DNA fingerprinting has been introduced to track down the presence of contamination by amplifying a highly polymorphic marker together with the test gene. The genotype in a fetus that deviates from the four possible combinations of parental

alleles indicates the possibility of contamination<sup>(21)</sup>.

#### Conclusion

Of all the genetic disorders, thalassemia is prevalent and causes a huge health and financial burden in Thailand. Carrier screening, providing genetic counseling and PND for couples at risk and termination of affected pregnancy is the most effective strategy to combat serious genetic diseases. The combination of choices of fetal sample retrieval methods and advanced molecular biology techniques enables PND of a growing number of genetic diseases. Future molecular analysis techniques include real-time PCR and microarray (microchip) are being developed and tested and will be very useful in the near future in term of reducing testing time and analyzing several mutations simultaneously. In the era of the Molecular Biology with the success of the Human Genome Project, it is the role of the obstetricians to make most use of the genetic knowledge to make sure that every family will have a new healthy member and consequently a healthy population for the country.

#### References

1. Petrou M, Modell B. Prenatal screening for haemoglobin disorders. *Prenat Diagn* 1995; 15: 1275-95.
2. Tongsong T, Wanapirak C, Sirivatanapa P, Sanguansermisri T, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, et al. Prenatal control of severe thalassaemia: Chiang Mai strategy. *Prenat Diagn* 2000; 20: 229-34.
3. Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1992; 51: 55-65.
4. Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994; 343: 1197-8.
5. Kalousek DK, Dill FJ. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science* 1983; 221: 665-7.
6. Rodeck CH, Campbell S. Umbilical-cord insertion as source of pure fetal blood for prenatal diagnosis. *Lancet* 1979; 1: 1244-5.
7. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F. A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results of fifty-three cases. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 146: 985-7.



8. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; 1: 347-9.
9. Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Wells D, Kunaviktikul C, Tongsong T, et al. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassemia and simultaneous detection of Down's syndrome using multiplex fluorescent PCR. *J Med Assoc Thai* 2006; 89: 918-27.
10. Hattori M, Yoshioka K, Sakaki Y. High-sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutations. *Electrophoresis* 1992; 13: 560-5.
11. Findlay I, Urquhart A, Quirke P, Sullivan K, Rutherford AJ, Lilford RJ. Simultaneous DNA 'fingerprinting', diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Hum Reprod* 1995; 10: 1005-13.
12. Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1389-401.
13. Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, et al. Preimplantation diagnosis of thalassemias. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 219-25.
14. Strom CM, Rechitsky S, Wolf G, Cieslak J, Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosum using two simultaneous single cell assays for a point mutation in the rhodopsin gene. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 351-5.
15. Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, Nopparatana C, Kanokpongsakdi S, Maggio A, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by reverse dot-blot hybridization. *Prenat Diagn* 1999; 19: 428-35.
16. Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 9-23.
17. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 905-9.
18. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2766-70.
19. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 523-8.
20. Bermudez MG, Piyamongkol W, Tomaz S, Dudman E, Sherlock JK, Wells D. Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2003; 23: 669-77.
21. Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, et al. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 2001; 21: 223-32.

---

## บทบาทของชีววิทยาระดับโมเลกุลในสูติศาสตร์—เทคนิคสมัยใหม่ในการวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดจีนเดียว

วีรวิทย์ ปิยะมงคล

การกลายพันธุ์ของจีนเดียวอาจทำให้เกิดความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่มีรูปแบบการสืบทอดแบบเมนเดล ซึ่งมีรายงานไว้กว่า 8,000 ชนิด การใช้กลยุทธ์ในการคัดกรองพาหะในประชากร ให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และบริการการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด และทางเลือกในการทำแท้งในครรภ์ที่ตรวจพบว่าทารกเป็นโรคสามารถลดจำนวนผู้ป่วยใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพทั่วโลก เทคนิคในการเอาเซลล์ทารกในครรภ์มาตรวจที่ใช้บ่อยได้แก่การตัดตรวจเนื้อรก การเจาะตรวจน้ำคร่ำ และการเจาะตรวจเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ จากนั้นจึงนำเซลล์ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสม โดยมักใช้เทคนิค karyotyping ในการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมและเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ใช้ในการตรวจความผิดปกติของจีนเดียว มีเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลสมัยใหม่หลายวิธีที่เป็นประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติในจีนเดียว การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อนเป็นทางเลือกขั้นสูงที่ช่วยให้คู่สมรสมีโอกาสเริ่มการตั้งครรภ์โดยมั่นใจว่าทารกปราศจากโรคทางพันธุกรรมจึงเป็นบทบาทของสูติแพทย์ที่จะใช้ประโยชน์ให้มากที่สุดจากความรู้ขั้นสูงทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้เพื่อให้ประชาชนมีสุขภาพดี

---

เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 80 พรรษา 5 ธันวาคม 2550

# บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.  
ครั้งที่ 7

วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550

โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน  
จังหวัดชลบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)







### Development of Multiplex Fluorescent Single Cell PCR Protocol for Preimplantation Genetic Diagnosis of alpha-Thalassemia

Piyamongkol, W.<sup>1\*</sup>, Vutyavanich, T.<sup>1</sup>, Piyamongkol, S.<sup>2</sup>, Sanguansermisri, T.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

#### Abstract

Thalassemias are the commonest single gene disorder and cause significant health problems in Thailand. Fetuses inherited homozygous alpha-thalassemia gene develop fetal hydrops and cause life-threatening maternal complications. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the earliest form of prenatal diagnosis which allows selection of unaffected embryos prior to establishment of a pregnancy, providing the couples the chance to start a pregnancy with a disease free baby. The aim of this study was to develop a multiplex fluorescent single cell PCR protocol for PGD of alpha-thalassemia for couples at risk. Novel set of primers (PW103, PW106, PW111 and PW112) was developed and tested as gap PCR for identifying alpha-thalassemia (SEA mutation) normal and mutant alleles, giving a 5' normal breakpoint fragment (288bp), a 3' normal breakpoint fragment (130bp) and a mutant breakpoint fragment (217bp) from a heterozygous sample. In addition, an internal control fragment (PW085, 108bp) and a polymorphic marker (PW057, 160-190bp) flanking to alpha-globin gene were also integrated. Fluorescent dyes with different colors were tagged to each set of primers to allow multiplex analysis of the PCR products using capillary electrophoresis on an automated sequencer (ABI PRISM® 3130). Multiplex PCR on 55 single buccal cells of the heterozygous couples gave amplification efficiency of 78.2%, 96.4%, 96.4%, 85.5% and 90.9% for the mentioned fragments, respectively, with allele drop out (ADO) rate of 8% for PW057 marker. Amplification on surplus human single blastomeres showed overall amplification efficiency of 60-84%. In the clinical PGD cycle, 14 embryos were subjected to embryo biopsy on day 3. Multiplex PCR analysis demonstrated 4 normal, 2 heterozygous, 6 affected embryos and 2 without result. Three unaffected embryos with good development were chosen for transfer on day 4. In conclusion, novel multiplex florescent single cell PCR protocol for alpha-thalassemia, SEA mutation was developed, tested and clinically applied on one PGD cycle.

**Keywords:** allele drop out (ADO), multiplex fluorescent single cell polymerase chain reaction (PCR), preimplantation genetic diagnosis (PGD), prenatal diagnosis (PND), alpha-thalassemia

\*Corresponding author.

Tel.: 0-5394-5553; Fax: 0-5394-6112

E-mail: wpiyamon@mail.med.cmu.ac.th







**ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย**

**การประชุมวิชาการครั้งที่ ๒๒**  
**และการประชุมสามัญประจำปี ๒๕๕๐**  
**เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐**

**๒๙ ตุลาคม - ๑ พฤศจิกายน ๒๕๕๐**  
**ณ อาคารเฉลิมพระบารมี ๕๐ ปี ซอยศูนย์วิจัย ถนนเพชรบุรีตัดใหม่ กรุงเทพฯ**

---

**Oral Presentation**


---

31 ตุลาคม 2550 ห้องสัมมนา 4-6

**Real-Time PCR for prenatal genetic diagnosis of beta-thalassemia**

Wirawit Piyamongkol MD, PhD<sup>\*</sup>;  
 Sirivipa Piyamongkol PhD<sup>\*\*</sup>;  
 Torpong Sanguansermisri MD<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>\*\*</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>\*\*\*</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

**ABSTRACT**

**Objectives:** First trimester prenatal diagnosis (PND), i.e. chorionic villous sampling (CVS), gives early results helping in early relieve of parental anxiety or safer termination of pregnancy methods. However, it needs complicated and time consuming DNA analysis. The aim of this study was to develop rapid and accurate Real-Time PCR protocols for beta-thalassemia mutations for PND.

**Methods:** Two couples at risk of having severe beta-thalassemia fetus carrying four different beta-thalassemia mutations underwent CVS procedures. Real-Time PCR protocols for beta-thalassemia mutations were developed, tested and clinically applied on prenatal samples.

**Results:** Couple A carried CD17 and CD41-42 mutations. Real-Time PCR analysis on chorionic villi detected normal alleles for both mutations. Couple B carried CD26 and CD71-72 mutations. Real-Time PCR on CVS sample showed both mutations.

**Conclusion:** Four novel Real-Time PCR protocols for 4 different beta-thalassemia mutations were developed and applied for PND of 2 families giving concordant results with traditional techniques.





การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 23  
และการประชุมสามัญประจำปี พ.ศ. 2551  
ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย  
โดยคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการ

**Theme:**  
**Optimal women's  
health care for  
daily practice**

วันอาทิตย์ที่ 12 - วันพุธที่ 15 ตุลาคม พ.ศ. 2551  
ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จ.ชลบุรี

## Oral Presentation

131008 ห้องมาตรฐานฯ (C10)

thalassemia 1 fetuses at mid-pregnancy among pregnancies at risk.

**Material and Method:** A total of 88 pregnancies (91 fetuses) at risk of Hb Bart's disease, undergoing MCA-PSV measurement before cordocentesis at 18-22 weeks of gestation were recruited into the study. The final diagnoses used as gold standard were based on fetal hemoglobin typing using high performance liquid chromatography.

**Results:** Of 88 pregnant women recruited into the study, the mean age was 28.3±5.7 years, the mean gestational age was 18.8±1.1 weeks, and the incidence of Hb Bart's disease was 22% (20 fetuses). If using MCA-PSV above 1.5 Multiple of Median (MoM) as a cut off point, sensitivity of MCA-PSV to detect affected fetuses was 85% (17 from 20 cases), specificity was 100%, and the positive predictive value and negative predictive value of MCA-PSV were 100% and 95.9% respectively. Three out of 20 fetuses with Hb Bart's disease had normal MCA-PSV.

**Conclusion:** MCA-PSV assessment at mid-pregnancy is a useful method to identify Hb Bart's disease with high sensitivity and specificity, and may reduce risk from unnecessary cordocentesis in some fetuses.

efficiency. In the first clinical PGD cycle, 14 embryos were analyzed, giving 4 normal, 2 heterozygous and 6 affected results. Three unaffected embryos were chosen for transfer on day-4, no pregnancy was resulted. In the second PGD cycle, 8 embryos were analyzed, one heterozygous embryo was transferred on day-6, resulting in one disease-free baby. Prenatal fetal hemoglobin analysis confirmed PGD results.

**Conclusion:** Novel PGD protocol for alpha-thalassemia-SEA was developed, tested and clinically applied on two PGD cycles. First baby following PGD of alpha-thalassemia in Thailand was reported here.

### Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia.

Wirawit Piyamongkol MD. PhD,\*  
Teraporn Vutyavanich MD. MMedSc,\*  
Torpong Sanguanserm Sri MD.\*\*

\* Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\*\* Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

#### ABSTRACT

**Objectives:** Thalassemias are common and cause significant health problems in Thailand. Fetuses inherited homozygous alpha-thalassemia gene develop fetal hydrops and cause life-threatening maternal complications. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the earliest form of prenatal diagnosis which allows selection of unaffected embryos prior to pregnancy establishment, providing couples the chance to start a pregnancy with unaffected baby. The aim of this study was to develop a multiplex fluorescent single cell PCR protocol for PGD of alpha-thalassemia-SEA for couples at risk.

**Methods:** Novel set of primers was developed and tested as gap PCR for identifying alpha-thalassemia-SEA mutation, including 3 normal loci, one mutant break-point and one linkage locus. One couple carrying alpha-thalassemia-SEA mutation underwent IVF procedures. Laser-assisted embryo biopsy was performed on day-3 and mutation analysis was carried out on an automated fluorescent DNA sequencer.

**Results:** Multiplex PCR on 55 single buccal cells of heterozygous couples gave an amplification efficiency of 78.2-96.4% and allele-drop out rate of 8%. Single blastomeres amplification showed 60-84% amplification



ISSN 15133346  
www.medicaltime.info

ปกนักร THAILAND'S LEADING MEDICAL JOURNAL

# เมดิคอลไทม์

MEDICALTIME

วารสารสำหรับผู้ประกอบการวิชาชีพ  
เวชกรรมและเภสัชกรรม

ปีที่ 9 ฉบับที่ 207  
ประจำวันที่ 1-15 มิถุนายน 2551

FREE SYMPOSIUM INSIDE

รู้จักทุกประเด็นความเคลื่อนไหวแวดวงบริการสุขภาพ

## จับกระแสธรรมชาติ สุขภาพแห่งชาติ ในระบบแพทย์ประจำ ครอบครัว

16 ข้อคิดจากชาว  
ปศุชาในลือทากอน

37 โครงการวิจัย  
ก่อนการพึ่งพิงสำหรับ  
โรคเรื้อรัง

เวทีวิจัย

**EZETROL™**  
(ezetimibe)  
and statin  
BETTER TOGETHER!

NEW in cholesterol research  
GREATER CHOLESTEROL REDUCTION  
THROUGH DUAL INHIBITION<sup>1,2</sup>

**Schering-Plough**  
Schering-Plough Ltd.  
150 Persimmon Road, Kenilworth, NJ 07033, USA  
Tel: 908.270.8000 Fax: 908.270.8001

**MSD**

Flexible Start Dose (FSD) starting doses with added power and a proven safety profile at the 80-mg titration dose

Flexible Start Dose

10 mg 20 mg 40 mg 80 mg

**LIPITOR**  
atorvastatin calcium  
tablets

**Pfizer**

LPT-THS 07.001

It is recommended that liver function tests be performed prior to and 12 weeks following both the initiation of therapy and any escalation of dose, and periodically thereafter. In ALL of ALL patients, dose reduction or withdrawal is recommended. In clinical trials, the most common adverse events were constipation, headache, dyspepsia, and abdominal pain.

For more information, please see full prescribing information.

โปรดอ่านข้อมูลผลิตภัณฑ์อย่างละเอียดก่อนใช้

โทร: 02-556-2000 หรือ 02-556-2001

I my family




**รศ.ดร.นพ.วิรัช ปิยะมงคล**
**ประวัติส่วนตัว**

พ.ศ. 2531 แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
พ.ศ. 2535 อนุมัติบัตรผู้เชี่ยวชาญ สาขาสรีรศาสตร์และรังสีวิทยา แพทยสภา  
พ.ศ. 2541 MSc in Prenatal Genetics & Fetal Medicine, University College, University of London

พ.ศ. 2544 Ph.D. in OB&GYN (Molecular Genetics), University College, University of London

พ.ศ. 2545 อนุมัติบัตรผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ สาขาเวชศาสตร์มารดาและทารก ในครรภ์ แพทยสภา

**ประวัติการทำงาน**

พ.ศ. 2531-2535 แพทย์ประจำบ้าน ภาควิชาสรีรศาสตร์และรังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2535-2540 อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรศาสตร์และรังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2540-2549 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำภาควิชาสรีรศาสตร์และรังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2540-2544 Research fellow, UCL Centre for Preimplantation Genetic Diagnosis, the Galton Laboratory, Department of Obstetrics & Gynaecology, University College, University of London

พ.ศ. 2549-ปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาสรีรศาสตร์และรังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ปัจจุบัน**

รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 ประจำภาควิชาสรีรศาสตร์และรังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**งานสอนและงานบริการที่เกี่ยวข้อง**

- ฝึกอบรมและปฏิบัติงานในศูนย์วิจัยก่อนคลอดและโรครากพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคธาลัสซีเมียและกลุ่มอาการดาวน์
- การวินิจฉัยก่อนคลอด โดยเทคนิคการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง การเจาะตรวจเยื่อรก การเจาะตรวจน้ำคร่ำ การเจาะตรวจเลือดสายสะดือทารก ในครรภ์ การรักษาทารกในครรภ์
- คลินิกสรีรวิทยาท้อง

**งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

- สตรี-บรีว
- การวินิจฉัยก่อนคลอด
- เทคนิคการตรวจโครโมโซมที่ผิดปกติ
- การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว
- การจัดการยีนและการวินิจฉัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- คณะอนุกรรมการประเมินรายงานวิจัย ในการฝึกอบรมและสอบความรู้ ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาสรีรศาสตร์-รังสีวิทยา ของราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย ตั้งแต่ พ.ศ. 2547
- กรรมการพิจารณาคุณภาพ วารสาร Prenatal Diagnosis ตั้งแต่ พ.ศ. 2546
- กรรมการพิจารณาคุณภาพ วารสาร Human Reproduction ตั้งแต่ พ.ศ. 2548
- กรรมการพิจารณาคุณภาพ วารสาร Annals of Human Biology ตั้งแต่ พ.ศ. 2548
- กรรมการพิจารณาคุณภาพ วารสาร Journal of Biochemical and Biophysical Methods ตั้งแต่ พ.ศ. 2550
- กรรมการพิจารณาข้อเสนอโครงการวิจัย พัฒนาและนวัตกรรม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ตั้งแต่ พ.ศ. 2550

**ผลงานวิจัย**

เป็นหัวหน้าโครงการและผู้ร่วมโครงการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติกว่า 40 เรื่อง

**แหล่งทุนวิจัย**

เป็นหัวหน้าโครงการที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนพัฒนา คณะแพทยศาสตร์ (ส่วนวิจัย) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สอ.), สกว.วิจัย (งบ.)

## โครงการวิจัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมีย

**โรคธาลัสซีเมีย**

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่พบได้มากที่สุดในโลก มีความชุกสูงในประชากรแถบเอเชีย และเป็นปัญหาใหญ่ทางสาธารณสุขปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ทารกที่ได้รับการถ่ายทอดยีนธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจะมีอาการซีดอย่างมากและเสียชีวิตในครรภ์ มารดาที่ตั้งครรภ์ทารกดังกล่าวมีความเสี่ยงสูงที่จะประสบภาวะแทรกซ้อนทางสูติศาสตร์ร้ายแรงถึงชีวิต ได้แก่ ครรภ์เป็นพิษ ภาวะคลอดยาก และภาวะตกเลือดก่อนคลอดและหลังคลอด ผู้ป่วยที่ได้รับการถ่ายทอดโรคเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจากบิดาและมารดาจะมีอาการซีดมาก จำเป็นต้องได้รับเลือดอย่างต่อเนื่อง มีภูมิคุ้มกันต่ำและประสบภาวะแทรกซ้อนร้ายแรงจากการให้เลือด ได้แก่ โรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบและเอดส์ ภาวะธาตุเหล็กคั่งในร่างกาย โรคเบาหวาน วิธีรักษาโรคเบต้าธาลัสซีเมียให้หายขาดโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูกยังเป็นวิธีที่ยั่งยืน มีความเสี่ยงสูง และมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก กลวิธีในการแก้ไขปัญหาระยะก่อนการฝังตัวที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบันคือ การควบคุมจำนวนผู้ป่วยใหม่ โดยการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงที่จะตั้งครรภ์บุตรที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ให้ความรู้และทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการเจาะตรวจเยื่อรกหรือการเจาะตรวจเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ และทำแท้งทารกที่เป็นโรคชนิดรุนแรง หากคู่สมรสต้องการครอบครัวที่มีสุขภาพแข็งแรง ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียจนถึงอายุ 30 ปี มีมูลค่าสูงถึง 6 ล้านบาทต่อคน จากจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่เกิดขึ้นปีละประมาณ 4,000 คน คิดเป็นภาระค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น 24,000 ล้านบาททุกปี จากภาระผู้ป่วยเดิมที่มีอยู่แล้ว 523,750 คน

**การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว**

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการเลือกตัวอ่อน (embryo selection) หรือ designer baby เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตร เป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มารดาที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มต้นการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปลอดจากโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis, PND) พบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งบุตรหรือภาวะทารกพิการอันเนื่องมาจากผลการวินิจฉัยก่อนคลอด การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นวิธีลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่ขัดต่อจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจำเป็นต้องใช้เทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เทคนิคการเก็บตัวอย่างจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy) กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว แล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าในโพรงมดลูก ข้อดีของเทคนิคนี้คือ การตัดตรวจ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไม่มีผลเสียต่อพัฒนาการของตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ จำนวนเซลล์ที่ได้เพียง 1-2 เซลล์เพื่อใช้ในการวินิจฉัย และระยะเวลาในการวินิจฉัยที่มีเพียง 24 ชั่วโมง เนื่องจากศูนย์การทำทารกหลอดแก้วส่วนใหญ่

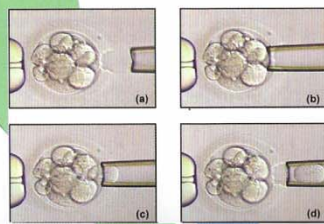


## เวชวิทยา

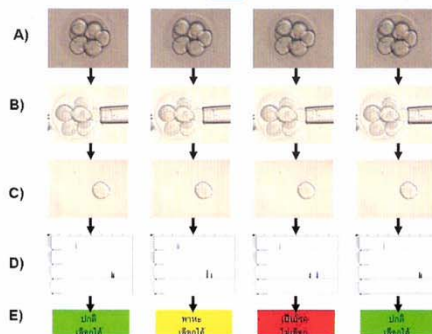
ต้องการที่จะใส่ตัวอ่อนเข้าในโพรงมดลูกในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ ทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคดังกล่าวให้มีความรวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง

มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่าง ๆ โดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ทางอณูชีววิทยา สำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยว เช่น ธาลัสซีเมีย ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นโครงการที่มีความละเอียดอ่อนและซับซ้อนสูง จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือของผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหลายสาขาวิชา ได้แก่ นรีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลการทำทารกหลอดแก้ว นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลตัวอ่อนมนุษย์ นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว และสูติแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลมารดาและทารกในครรภ์

การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามตำแหน่งของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน (mutation) ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ ปัญหาสำคัญในการตรวจวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดียว ได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplification failure, AF) ปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาไม่ได้ผลการวินิจฉัยหรือการวินิจฉัยผิดพลาดได้



เทคนิคการดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (a) จับตัวอ่อนไว้ให้คงโดย holding pipette ด้านซ้าย เจาะเปลือก zona pellucida ด้วยเลเซอร์ (b), (c) และ (d) เซลล์เดี่ยวถูกดูดออกมาด้วยความระมัดระวังโดย biopsy pipette ปลายของช่องของเปลือก zona pellucida ที่เปิดเอาไว้ให้ผลการวิเคราะห์ สร.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช



การวินิจฉัยก่อนคลอด (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) สำหรับโรคธาลัสซีเมีย A) ตัวอ่อนจากการทำกราดหลอดแก้วระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ B) การดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนโดยเครื่องมือ micromanipulator C) เซลล์เดี่ยวที่ได้จากตัวอ่อนเคลือบเพื่อการวิเคราะห์ยีน D) ผลการวิเคราะห์ยีนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ชนิดเรืองแสง E) เลือกตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคเพื่อใส่ในโพรงมดลูกของมารดาในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ การทำกราดหลอดแก้วและการดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนทำโดย สร.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช การวิเคราะห์ยีนโดย สร.ดร.นพ.ธีระชัย ปิยะมงคล

สถานการณ์ในประเทศไทย โดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, กองทุนพัฒนาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), สภาวิจัย (วช.) และบริษัท ออร์กานอน (ประเทศไทย) จำกัด รศ.ดร.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล และ รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช และคณะผู้ทำงาน ได้เริ่มให้บริการการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 คน ประสบความสำเร็จในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียก่อนการฝังตัวเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทารกจากการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวรายแรกนี้เป็นเพศชาย คลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียีนผิดปกติของเบต้าธาลัสซีเมีย ผลความสำเร็จดังกล่าวได้รับการนำเสนอในการประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 11 ประจำปี 2548 ในวันที่ 1-2 กันยายน 2548, ได้รับรางวัลชมเชยประเภทการวิจัยทางคลินิกจากการแสดงผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการวันมหิดล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ครั้งที่ 29 ในวันที่ 23 กันยายน 2548, นำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปี “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ในวันที่ 13-15 ตุลาคม 2548, ในการประชุมวิชาการประจำปีราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย ในวันที่ 19-21 ตุลาคม 2548 และได้รับการคัดเลือกให้นำเสนอผลงานในวันวิชาการมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ครั้งที่ 1 ในวันที่ 8-10 ธันวาคม 2548

### บทสรุป

โดยสรุป การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวหรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครบกโดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมียีนผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่า สามารถทำการตรวจได้ทั้งความผิดปกติทางโครโมโซมและความผิดปกติทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยว การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในการตรวจโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่มีความจำเพาะในแต่ละความผิดปกติ ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการพัฒนาอย่างมาก สถานการณ์ในประเทศไทย การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคเบต้าและอัลฟาธาลัสซีเมียประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบบรรยาย

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พวบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.  
ครั้งที่ 8

วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551

โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ  
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)





### Preimplantation Genetic Diagnosis of alpha-Thalassemia

Piyamongkol, W.<sup>1\*</sup>, Vutyavanich, T.<sup>1</sup>, Sanguansermisri, T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

#### Abstract

Thalassemias are the commonest single gene disorder and cause significant health problems in Thailand. Fetuses inherited homozygous alpha-thalassemia gene develop fetal hydrops and cause life-threatening maternal complications. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the earliest form of prenatal diagnosis which allows selection of unaffected embryos prior to pregnancy establishment, providing the couples the chance to start a pregnancy with unaffected baby. The aim of this study was to develop a multiplex fluorescent single cell PCR protocol for PGD of alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> for couples at risk. Novel set of primers was developed and tested as gap PCR for identifying alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> mutation. Multiplex PCR on 55 single buccal cells of heterozygous couples gave an amplification efficiency of 78.2-96.4%. Single blastomeres amplification showed 60-84% amplification efficiency. In the first clinical PGD cycle, 14 embryos were analyzed, three unaffected embryos were chosen for transfer on day-4, no pregnancy was resulted. In the second PGD cycle, 8 embryos were analyzed, one heterozygous embryo was transferred on day-6, resulting in one disease-free baby. Prenatal fetal hemoglobin analysis confirmed PCR results. In conclusion, novel PGD protocol for alpha-thalassemia<sup>-SEA</sup> was developed, tested and clinically applied on two PGD cycles. First baby following PGD of alpha-thalassemia in Thailand was reported here.

**Keywords:** allele drop out (ADO), multiplex fluorescent single cell polymerase chain reaction (PCR), preimplantation genetic diagnosis (PGD), prenatal diagnosis (PND), alpha-thalassemia

\*Corresponding author.

Tel.: 0-5394-5553; Fax: 0-5394-6112

E-mail: wpiyamon@mail.med.cmu.ac.th



วารสารเทคนิคการแพทย์

ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 (ฉบับเสริม) เมษายน 2552  
Vol.33 (1) Supplement April 2009

Journal of the Medical Technologist Association of Thailand



## ครั้งที่ 33 การประชุมวิชาการประจำปี

- ❖ วิธีการทำผลงานวิชาการและเกณฑ์การประเมินผลงาน
- ❖ เครื่องมือในการบริหารห้องปฏิบัติการ:  
โปรแกรมการวิเคราะห์ต้นทุน
- ❖ การบริหารบุคคลตาม พ.ร.บ.ข้าราชการพลเรือน พ.ศ.2551
- ❖ Learn and Share in Lean Management in Clinical Laboratory
- ❖ Problems and Pitfalls in HIV Laboratory
- ❖ Recent Advances and Quality in Laboratory Diagnosis in Thalassemia
- ❖ Scientific and Professional Writing Skills for MT
- ❖ Biology of Dengue Virus and Vaccine Development
- ❖ Antibody Therapy: Re-emerging Therapeutic Agents
- ❖ Detection of Common Resistant Bacteria: Update and Pitfalls
- ❖ Pitfalls in Blood Banking
- ❖ Mycobacterium : Approach Ways to Diagnosis and Identification



## เทคนิคการแพทย์กับ ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ

28 เมษายน - 1 พฤษภาคม 2552 โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย



## การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD)

รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล  
ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (embryo selection) เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มารดาที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปลอดโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis, PND) พบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งหรือภาวะทารกพิการอันเนื่องมาจากหัตถการในการวินิจฉัยก่อนคลอด การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นวิธีการลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่ขัดต่อจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

โดยทั่วไปแล้ว ข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวเหมือนกันกับการวินิจฉัยก่อนคลอด คือใช้ในการวินิจฉัยโรคร้ายแรง ซึ่งได้แก่ความผิดปกติของโครโมโซมทั้งแบบจำนวนนับและแบบ translocation (Conn et al., 1998) และโรคพันธุกรรมชนิดเดี่ยว (Piyamongkol et al., 2001b) การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นประโยชน์กับครอบครัวหรือกลุ่มศาสนาที่ต้องการมีบุตรที่ปราศจากโรคพันธุกรรมแต่ไม่ต้องการทำแท้งบุตร แม้ว่าตามกฎหมายของแมนเดล ความเสี่ยงที่ครอบครัวจะมีทารกผิดปกติสำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนด้อย (ได้แก่ อัลฟาและบีต้าธาลัสซีเมียในประเทศไทย) ในแต่ละครรภ์มีเพียงร้อยละ 25 แต่ก็ยังมีบางครอบครัวที่ตรวจพบว่าทารกมีความผิดปกติร้ายแรงในโรคพันธุกรรมดังกล่าวและต้องทำแท้งบุตรติดต่อกันถึง 4 ครรภ์ โดยยังไม่เคยมีทารกปกติเลย การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นทางเลือกสำหรับครอบครัวดังกล่าวที่จะให้โอกาสเริ่มต้นการตั้งครรภ์โดยมีทารกที่ปราศจากโรค ไม่ต้องทนทุกข์ทรมานจากการทำแท้งบุตรอีกต่อไป นอกจากนี้ โดยปกติแล้วโรคพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดมะเร็งร้ายแรงหรือโรคร้ายแรงที่แสดงอาการเมื่ออายุ 30-50 ปี (ได้แก่ familial adenomatous polyposis coli, FAPC และ Huntington's chorea) ไม่ถือเป็นข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนคลอดและการทำแท้งบุตร อย่างไรก็ตามโรคพันธุกรรมดังกล่าวเป็นโรคร้ายแรงที่ครอบครัวไม่ต้องการให้สมาชิกในครอบครัวประสบเคราะห์กรรมอีก การคัดเลือกตัวอ่อนที่ปราศจากพันธุกรรมผิดปกติดังกล่าวจึงเป็นทาง

เลือกที่ยอมรับกันได้มากกว่าการวินิจฉัยก่อนคลอด (Ao *et al.*, 1998; Sermon *et al.*, 1998) นอกจากนี้ คู่สมรสที่มีบุตรยากหรือประสบปัญหาแท้งบุตรซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยมีสาเหตุเนื่องมาจากมีความผิดปกติของโครโมโซมชนิด translocation แฝงอยู่ สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนปกติเพื่อใส่ในโพรงมดลูก และตั้งครรภ์โดยมีทารกปกติได้

การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Alan Handyside ชาวอังกฤษเป็นผู้ตัดเซลล์ blastomere จากตัวอ่อนระยะ cleavage ซึ่งมี 8-10 เซลล์ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจวินิจฉัยเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซมเพศโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ที่โรงพยาบาล Hammersmith กรุงลอนดอน (Handyside *et al.*, 1990) ต่อมาก็ได้มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่างๆ เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสมัยใหม่ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridisation (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นจำนวนนับและที่เป็น translocation และใช้ในการตรวจเพศของตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดบนโครโมโซมเพศ (ส่วนใหญ่เป็น X-linked recessive) ส่วนโรคพันธุกรรมชนิดอื่นก็ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) (Wells and Delhanty, 2001)

#### การตัดตรวจเซลล์ที่ระยะ 8-10 เซลล์ (Cleavage stage embryo biopsy)

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ เทคนิคการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การตัดตรวจเซลล์ระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy) (Sermon *et al.*, 2005) กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว โดยใช้สารละลาย acid Tyrodes หรือลำแสงเลเซอร์ หรือใช้เข็มของปลาย pipette ตัด แล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม (Handyside *et al.*, 1989) ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก

#### การตัดตรวจโพลาร์บอดี (Polar body biopsy)

เทคนิคอื่นที่มีผู้ใช้ในการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ การตัดตรวจ polar body (Munne *et al.*, 1995; Verlinsky *et al.*, 1992) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่แยกออกมาจากไข่ (oocyte) ในการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และจะสลายไป บางคนจึงเรียกวิธีนี้

ว่าเป็น preconception diagnosis ข้อด้อยของเทคนิคการตรวจนี้ได้แก่ การตรวจโดยวิธีนี้ไม่สามารถทำนายยีนที่จะมาจากตัวสุจิได้ จึงไม่สามารถใช้ในการเลือกเพศตัวอ่อนได้ และไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเด่นที่บิดาเป็นพาหะได้ สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนด้อย แม้ไข่บางฟองที่มียีนที่ผิดปกติ แต่มีโอกาสร้อยละ 50 ที่จะปฏิสนธิกับตัวสุจิที่มียีนปกติ และให้กำเนิดตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคร้ายแรงได้ วิธีการตรวจนี้จึงทำให้สูญเสียไข่ดังกล่าวไปถึงครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้ เทคนิคการตรวจนี้ยังไม่สามารถทำนายความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นหลังการปฏิสนธิได้ ได้แก่ ภาวะ mosaicism ตัวอ่อนที่เกิดจากไข่ดังกล่าวจึงยังมีความเสี่ยงที่จะมีความผิดปกติอยู่

#### การตัดตรวจเซลล์ระยะบลาสโตซิส (Blastocyst biopsy)

การตัดตรวจเซลล์ตัวอ่อนที่ระยะ blastocyst (Muggleton Harris *et al.*, 1995) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวได้ ในวันที่ 6-7 หลังการปฏิสนธิ ตัวอ่อนจะอยู่ในระยะ blastocyst ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 120 เซลล์ มีการแยกเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด คือ inner cell mass ซึ่งจะเจริญไปเป็นตัวอ่อน และ trophoctoderm ซึ่งจะเจริญไปเป็นรกและถุงน้ำ เมื่อเจาะรูที่ zona pellucida แล้วเลี้ยงตัวอ่อนต่อไป เซลล์ trophoctoderm บางส่วนจะยื่นออกมาจากรูดังกล่าว สามารถตัดเซลล์ดังกล่าวไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ถึง 10-30 เซลล์ ทำให้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคกระทำได้ง่ายขึ้นมากกว่าการตรวจวิเคราะห์จากเซลล์เดี่ยว อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อด้อยที่ผลการตรวจกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นรกอาจมีความลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน (ภาวะ mosaicism) และการเลี้ยงตัวอ่อนในตู้ต่อไปจนถึงระยะ blastocyst ทำให้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีพอที่จะใส่ในโพรงมดลูกได้เหลือน้อยลง เมื่อเทคนิคการเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst มีประสิทธิภาพมากขึ้น เชื่อว่าการตัดตรวจเซลล์ที่ระยะนี้อาจจะเป็นที่นิยมมากขึ้น

#### Fluorescent in situ hybridisation (FISH)

ในระยะแรกมีผู้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมเพศ (Handyside *et al.*, 1989) แต่ต่อมาพบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนอาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Handyside and Delhanty, 1993) เนื่องจากปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และเทคนิค PCR ไม่สามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ ในกรณีตัวอ่อนที่มีโครโมโซม 45,XO (Turner's syndrome) ซึ่งผลการตรวจโดยเทคนิค PCR จะเหมือนกันกับ 46,XX ก็มีความเสี่ยงที่จะมีโรคพันธุกรรมดังกล่าวเช่นเดียวกับทารกเพศชาย จึงมีผู้แนะนำให้ใช้เทคนิค FISH ในการตรวจเลือกเพศตัวอ่อน ซึ่งสามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ และไม่มีปัญหา ADO ทำให้การวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้น



### ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยว (Single cell PCR)

การตรวจวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยเทคนิค PCR ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน (mutation) ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการปัญหาสำคัญในการวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยวได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplification failure, AF) ปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ปัญหา AF อาจเกิดจากการที่เซลล์ดังกล่าวอาจไม่มีนิวเคลียสหรืออยู่ในระหว่างการย่อยสลาย บางครั้งเซลล์ที่ต้องการตรวจอาจหล่นหายไปในช่วงการนำใส่ลงในหลอดวิเคราะห์ นอกจากนี้ ส่วนผสมของสารละลายและโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ก็อาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของ PCR (Piyamongkol *et al.*, 2003)

ปัญหา ADO คือการตรวจไม่พบยีนใดยีนหนึ่ง (allele) ของสองยีนในเซลล์พันธุ์ทาง (heterozygote) ทำให้การวินิจฉัยสรุปผลผิดว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์พันธุ์แท้ (homozygote) โดยทั่วไปแล้วปัญหา ADO พบได้ประมาณร้อยละ 2-20 (Ray and Handyside, 1996) สาเหตุที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีผู้ตั้งสมมุติฐานว่าปัญหานี้ อาจเกิดจากการที่ DNA เริ่มย่อยสลาย การเข้าถึงส่วนของ DNA ที่ต้องการตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ไม่ดี และเทคนิคการย่อยเซลล์ที่แตกต่างกัน มีผู้พยายามลดอุบัติการณ์ของปัญหานี้โดยแนะนำเทคนิค fluorescent PCR (F-PCR), การเพิ่มอุณหภูมิ denaturation ในปฏิกิริยาลูกโซ่ และการใช้น้ำยาลย่อยเซลล์ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี linkage analysis ร่วมด้วย และการสรุปผลการวินิจฉัยจากสองเซลล์สำหรับแต่ละตัวอ่อน จะช่วยลดความเสี่ยงที่จะวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001a)

ปัญหาการปนเปื้อนเป็นปัญหาใหญ่อีกปัญหาหนึ่งในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยวสามารถป้องกันการปนเปื้อน DNA จากสิ่งแวดล้อมได้โดยการเตรียมการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ในห้องแยกพิเศษที่สะอาดและอยู่ห่างจากบริเวณที่ทำการตรวจวิเคราะห์ สารเคมี และน้ำยาเลี้ยงเซลล์ควรได้รับการตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนอยู่เสมอ ในขั้นตอนการปฏิสนธิควรใช้เทคนิค intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน DNA จากตัวสุจิ นอกจากนี้ยังควรกำจัดเซลล์ cumulus ที่อยู่รอบๆ ไข่ให้หมดก่อนการปฏิสนธิเพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน DNA จากมารดา การใช้เทคนิค nested PCR โดยนำ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ครั้งแรกมาเป็นต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่ครั้งที่สองซึ่งใช้ primers อีกชุดหนึ่งที่ขยายได้ส่วนของ DNA ที่สั้นลงแต่อยู่ในส่วนของ DNA จากชั้นแรกสามารถช่วยลดปัญหาจากการปนเปื้อนได้ มีผู้ใช้เอ็นซายม์เพื่อย่อยสลาย DNA แปลกปลอมก่อนที่จะใส่เซลล์ที่



ต้องการตรวจวินิจฉัย (Sermon *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อน DNA จากมารดา ยังเป็นปัญหาสำคัญที่ยังพบได้และเป็นสาเหตุของการวินิจฉัยผิดพลาด สำหรับโรคทางพันธุกรรม ชนิดยีนเดี่ยวที่มีลักษณะเด่น การปนเปื้อน DNA จากมารดาจะไม่ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาด แต่จะทำให้จำนวนของตัวอ่อนปกติที่สามารถใส่ในโพรงมดลูกได้ลดลง สำหรับโรคทางพันธุกรรม ชนิดยีนเดี่ยวที่มีลักษณะด้อย (ได้แก่ โรคอัลฟาและบีต้าธาลัสซีเมียในประเทศไทย) การปนเปื้อน DNA จากมารดาที่เป็นพันธุทางในเซลล์ที่เป็นโรคพันธุแท้ จะทำให้การวินิจฉัยสรุปว่าตัวอ่อน นั้นเป็นพันธุทาง (แฝง) และเลือกตัวอ่อนที่เป็นโรคดังกล่าวใส่ในโพรงมดลูก การตรวจวิเคราะห์ โดยใช้ DNA fingerprinting ร่วมด้วย จะช่วยบอกได้ว่ามี DNA ปนเปื้อนหรือไม่ และ ป้องกันการวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001b)

### บทสรุป

โดยสรุป การตรวจ PGD หรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครครห์ โดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำ แท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมีข้อผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่าและ ไม่ผิดจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย สถานการณ์ในประเทศไทย โดยการสนับสนุนของคณะ แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สภาวิจัย (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), บริษัท เอไอ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด และบริษัท เซริง พลาว ออร์แกนอน (ประเทศไทย) จำกัด หัวหน้าโครงการฯ รศ.ดร.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล และ รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช ได้ริเริ่มให้บริการการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมีย โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ.2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคบีต้าธาลัสซีเมียเป็น ครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทารกเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 น้ำหนักแรกคลอด 2,900กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือด ทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียีนผิดปกติของบีต้าธาลัสซีเมีย (Piyamongkol *et al.*, 2006) ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรค อัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นครั้งที่สองของโลก ได้ทารกเพศชายคลอด เมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2551 น้ำหนักแรกคลอด 3,280 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการ ตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่เป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (Piyamongkol *et al.*, in preparation)

## References

- Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* 15: 140–144.
- Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet* 102: 117–123.
- Handyside AH, Delhanty JDA. 1993. Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease. In: Edwards RG, ed. *Preimplantation diagnosis of human genetic disease*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 239–270.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344: 768–770.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1: 347–349.
- Muggleton Harris AL, Glazier AM, Pickering S, Wall M. 1995. Genetic diagnosis using polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 10: 183–192.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. 1995. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10: 1014–1020.
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 9: 411–420.
- Piyamongkol W, Harper JC, Delhanty JD, Wells D. 2001a. Preimplantation genetic diagnostic protocols for alpha- and beta-thalassaemias using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 21: 753–759.
- Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, et al. 2001b. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 21: 223–232.
- Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Wells D, Kunaviktikul C, Tongsong

T, et al. 2006. A successful strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis of beta-thalassemia and simultaneous detection of Down's syndrome using multiplex fluorescent PCR. *J Med Assoc Thai* 89: 918–927.

Ray PF, Handyside AH. 1996. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2: 213–218.

Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, et al. 1998. Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat Diagn* 18: 1427–1436.

Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, et al. 2005. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May–December 2001. *Hum Reprod* 20: 19–34.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, et al. 1992. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 12: 103–110.

Wells D, Delhanty JD. 2001. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Mol Med Today (Trends Mol Med)* 7: 23–30.



ชมรมเวชศาสตร์มารดาและทารกในครรภ์ (ไทย)

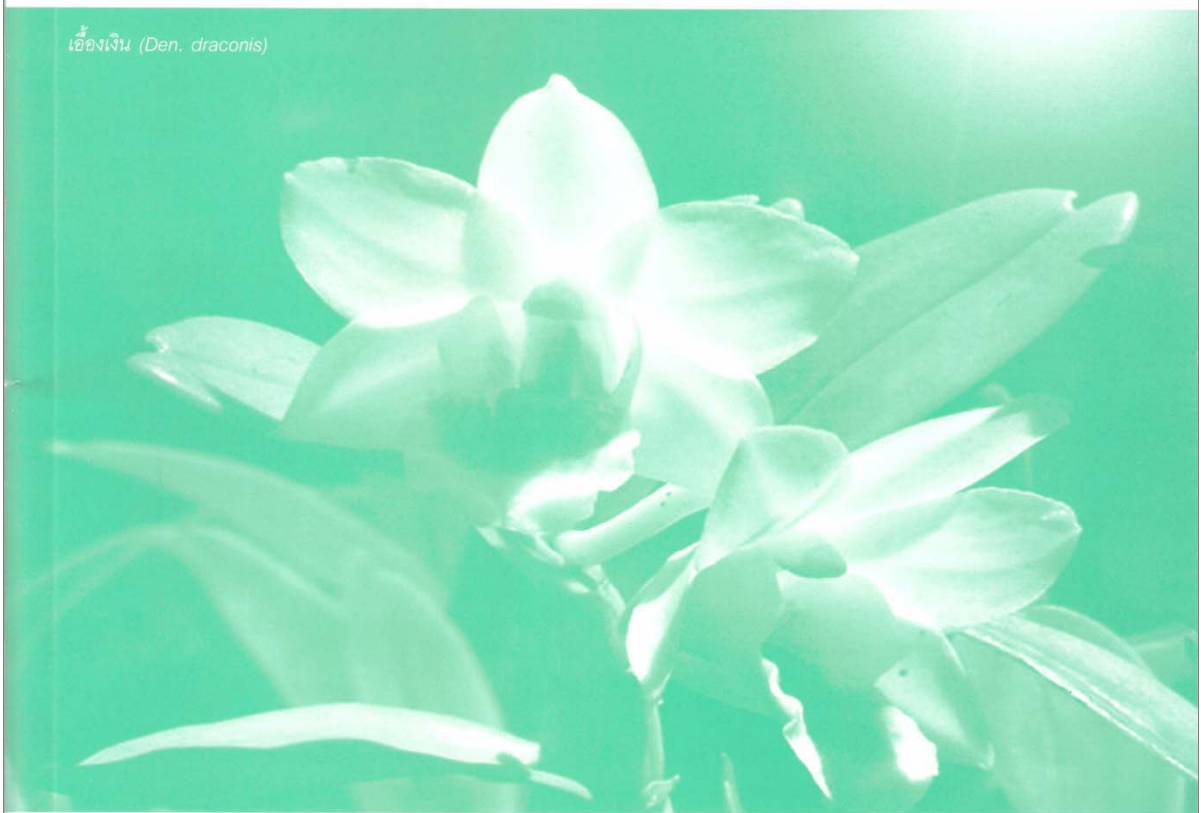
ร่วมกับ

ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย

การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 7 ประจำปี 2552

Humanized Health Care in Maternal and Fetal Medicine

เอื้องเงิน (Den. draconis)



วันที่ 6 – 8 พฤษภาคม 2552

ณ ห้องเพชรบุรี 1-3

โรงแรม ฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี





## Preimplantation Genetic Diagnosis

รศ.ดร.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล

ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### Preimplantation genetic diagnosis (PGD)

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (embryo selection) เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มารดาที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปลอดโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่เกิดการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis, PND) พบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งหรือภาวะทารกพิการ อันเนื่องมาจากหัตถการในการวินิจฉัยก่อนคลอด การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นวิธีลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่ขัดต่อจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

โดยทั่วไปแล้ว ข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวเหมือนกันกับการวินิจฉัยก่อนคลอด คือใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคร้ายแรงเท่านั้น ซึ่งได้แก่ความผิดปกติของโครโมโซมทั้งแบบจำนวนนับและแบบ translocation<sup>12</sup> และโรคพันธุกรรมยีนเดี่ยว<sup>3,44</sup> การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นประโยชน์กับครอบครัวหรือกลุ่มศาสนาที่ต้องการมีบุตรที่ปราศจากโรคพันธุกรรมแต่ไม่ต้องการทำแท้งบุตร แม้ว่าตามกฎหมายของเม็กซิโก ความเสี่ยงที่ครอบครัวจะมีทารกผิดปกติสำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนด้อย (ได้แก่ อัลฟาและบีต้าธาลัสซีเมีย ในประเทศไทย) ในแต่ละครรภ์มีเพียงร้อยละ 25 แต่ก็มีบางครอบครัวที่ตรวจพบว่าทารกมีความผิดปกติร้ายแรงในโรคพันธุกรรมดังกล่าวและต้องทำแท้งบุตรติดต่อกันถึง 4 ครรภ์ โดยยังไม่เคยมีทารกปกติเลย การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นทางเลือกสำหรับครอบครัวดังกล่าวที่จะให้โอกาสเริ่มต้นการตั้งครรภ์โดยมีทารกที่ปราศจากโรค ไม่ต้องทนทุกข์ทรมานจากการทำแท้งบุตรอีกต่อไป นอกจากนี้ โดยปกติแล้วโรคพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดมะเร็งร้ายแรงหรือโรคร้ายแรงที่แสดงอาการเมื่ออายุ 30-50 ปี (ได้แก่ familial adenomatous polyposis coli, FAPC และ Huntington's chorea) ไม่ถือเป็นข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนคลอด และการทำแท้งบุตร อย่างไรก็ตามโรคพันธุกรรมดังกล่าวเป็นโรคร้ายแรงที่ครอบครัวไม่ต้องการให้สมาชิกในครอบครัวประสบเคราะห์กรรมอีก การคัดเลือกตัวอ่อนที่ปราศจากพันธุกรรมผิดปกติดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกที่ยอมรับกันได้มากกว่าการวินิจฉัยก่อนคลอด<sup>5,66</sup> นอกจากนี้ คู่สมรสที่มีบุตรยากหรือประสบปัญหาแท้งบุตรซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยมีสาเหตุเนื่องมาจากมีความผิดปกติของโครโมโซมชนิด translocation ผังอยู่ สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนปกติเพื่อใส่ในโพรงมดลูก และตั้งครรภ์โดยมีทารกปกติได้

การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Alan Handyside ชาวอังกฤษเป็นผู้ตัดเซลล์ blastomere จากตัวอ่อนระยะ cleavage ซึ่งมี 8-10 เซลล์ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจวินิจฉัยเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซมเพศโดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ที่โรงพยาบาล Hammersmith กรุงลอนดอน<sup>7</sup> ต่อมาก็ได้มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสสมัยใหม่ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridisation (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นจำนวนนับและที่เป็น translocation และใช้ในการตรวจเพศของตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดบนโครโมโซมเพศ (ส่วนใหญ่เป็น X-linked recessive) ส่วนโรคพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR)<sup>8</sup>

#### Cleavage stage embryo biopsy

เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ การทำ PGD จำเป็นต้องใช้เทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เทคนิคการเก็บตัวอย่างจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การตัดตรวจเซลล์ระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy)<sup>9</sup> กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว โดยใช้สารละลาย acid Tyrodes หรือลำแสงเลเซอร์ หรือใช้เข็มของปลาย pipette ตัดแล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม<sup>10</sup> ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก

#### Polar body biopsy

เทคนิคอื่นที่มีผู้ใช้ในการเก็บตัวอย่างในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ การตัดตรวจ polar body<sup>11;12</sup> ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่แยกออกมาจากไข่ (oocyte) ในการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และจะสลายไป บางคนจึงเรียกวิธีนี้เป็น preconception diagnosis ข้อดีของเทคนิคการตรวจนี้ได้แก่ การตรวจโดยวิธีนี้ไม่สามารถทำนายยีนที่จะมาจากตัวสุจิได้ จึงไม่สามารถใช้ในการเลือกเพศตัวอ่อนได้ และไม่สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเด่นที่บิดาเป็นพาหะได้ สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนด้อย แม้ไข่บางฟองที่มียีนที่ผิดปกติ แต่มีโอกาสร้อยละ 50 ที่จะปฏิสนธิกับตัวสุจิที่มียีนปกติ และให้กำเนิดตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคร้ายแรงได้ วิธีการตรวจนี้จึงทำให้สูญเสียไข่ดังกล่าวไปถึงครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้ เทคนิคการตรวจนี้ยังไม่สามารถทำนายความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นหลังการปฏิสนธิได้ ได้แก่ ภาวะ mosaicism ตัวอ่อนที่เกิดจากไข่ดังกล่าวจึงยังมีความเสี่ยงที่จะมีความผิดปกติอยู่

#### Blastocyst biopsy

การตัดตรวจเซลล์ตัวอ่อนที่ระยะ blastocyst<sup>13</sup> เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวได้ ในวันที่ 6-7 หลังการปฏิสนธิ ตัวอ่อนจะอยู่ในระยะ blastocyst ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 120 เซลล์ มี

การแยกเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด คือ inner cell mass ซึ่งจะเจริญไปเป็นตัวอ่อน และ trophoctoderm ซึ่งจะเจริญไปเป็นรกและถุงน้ำ เมื่อเจาะรูที่ zona pellucida แล้วเลี้ยงตัวอ่อนต่อไป เซลล์ trophoctoderm บางส่วนจะยื่นออกมาจากรูดังกล่าว สามารถตัดเซลล์ดังกล่าวไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ถึง 10-30 เซลล์ ทำให้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคกระทำได้ง่ายขึ้นมากกว่าการตรวจวิเคราะห์จากเซลล์เดียว อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อด้อยที่ผลการตรวจกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นรกอาจมีความลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน (ภาวะ mosaicism) และการเลี้ยงตัวอ่อนในตู้บดต่อไปจนถึงระยะ blastocyst ทำให้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีพอที่จะใส่ในโพรงมดลูกได้เหลือน้อยลง เมื่อเทคนิคการเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst มีประสิทธิภาพมากขึ้น เชื่อว่าการตัดตรวจเซลล์ที่ระยะนี้อาจจะเป็นที่นิยมมากขึ้น

#### Fluorescent in situ hybridisation (FISH)

ในระยะแรกมีผู้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมเพศ<sup>10</sup> แต่ต่อมาพบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนอาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้<sup>14</sup> เนื่องจากปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และเทคนิค PCR ไม่สามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ ในกรณีตัวอ่อนที่มีโครโมโซม 45,XO (Turner's syndrome) ซึ่งผลการตรวจโดยเทคนิค PCR จะเหมือนกันกับ 46,XX ก็มีความเสี่ยงที่จะมีโรคพันธุกรรมดังกล่าวเช่นเดียวกับทารกเพศชาย จึงมีผู้แนะนำให้ใช้เทคนิค FISH ในการตรวจเลือกเพศตัวอ่อน ซึ่งสามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ และไม่มีปัญหา ADO ทำให้การวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้น

#### Preimplantation genetic screening (PGS)

นอกจากประโยชน์ของการใช้เทคนิค FISH ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมในจำนวนนับและชนิด translocation แล้ว มีผู้ประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการทำทารกหลอดแก้วทั่วไปที่มีข้อบ่งชี้เนื่องจากภาวะมีบุตรยากเพื่อตรวจคัดกรองความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมคู่ที่พบบ่อยในมนุษย์ (ได้แก่ คู่ที่ 21, 18, 13, X และ Y) เพื่อเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์และหลีกเลี่ยงการตั้งครรภ์ทารกที่มีความผิดปกติของโครโมโซม<sup>15</sup> โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมารดาที่อายุมากกว่า 35 ปี มีประวัติแท้งบุตรตั้งแต่ 2 ครั้งขึ้นไป และเคยทำทารกหลอดแก้วแต่ไม่ประสบความสำเร็จอย่างน้อย 3 ครั้ง การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวในลักษณะนี้เรียกว่า PGD for aneuploidy screening (PGS)

#### Single cell PCR

การตรวจวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวโดยเทคนิค PCR ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน (mutation) ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ ปัญหาสำคัญในการวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่จากเซลล์เดียวได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาถูกโซ่ (amplification failure, AF) ปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ปัญหา AF อาจเกิดจากการที่เซลล์ดังกล่าวอาจไม่มีนิวเคลียสหรืออยู่ในระหว่างการย่อยสลาย บางครั้งเซลล์ที่ต้องการตรวจอาจหล่นหายไปในช่วงการนำใส่



ลงในหลอดวิเคราะห์ นอกจากนี้ ส่วนผสมของสารละลายและโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาถูกโซ่ก็อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของ PCR

ปัญหา ADO คือการตรวจไม่พบยีนใดยีนหนึ่ง (allele) ของสองยีนในเซลล์พันธุ์ทาง (heterozygote) ทำให้การวินิจฉัยสรุปผลผิดว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์พันธุ์แท้ (homozygote) โดยทั่วไปแล้วปัญหา ADO พบได้ประมาณร้อยละ 2-20<sup>16</sup> สาเหตุที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีผู้ตั้งสมมติฐานว่าปัญหานี้ อาจเกิดจากการที่ DNA เริ่มย่อยสลาย การเข้าถึงส่วนของ DNA ที่ต้องการตรวจโดยปฏิกิริยาถูกโซ่ได้ไม่ดี และเทคนิคการย่อยเซลล์ที่แตกต่างกัน มีผู้พยายามลดอุบัติการณ์ของปัญหานี้โดยแนะนำเทคนิค fluorescent PCR (F-PCR), การเพิ่มอุณหภูมิ denaturation ในปฏิกิริยาถูกโซ่ และการใช้น้ำยาล้างเซลล์ชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี linkage analysis ร่วมด้วย และการสรุปผลการวินิจฉัยจากสองเซลล์สำหรับแต่ละตัวอ่อน จะช่วยลดความเสี่ยงที่จะวินิจฉัยผิดพลาดได้<sup>17</sup>

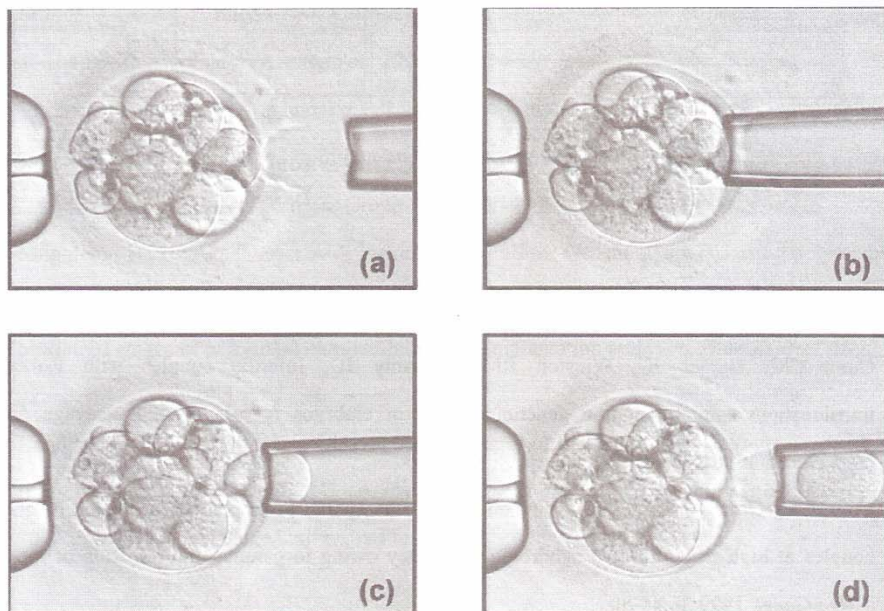
ปัญหาการปนเปื้อนเป็นปัญหาใหญ่อีกปัญหาหนึ่งในการทำปฏิกิริยาถูกโซ่จากเซลล์เดี่ยว สามารถป้องกันการปนเปื้อน DNA จากสิ่งแวดล้อมได้โดยการเตรียมการทำปฏิกิริยาถูกโซ่ในห้องแยกพิเศษที่สะอาด และอยู่ต่างที่กับบริเวณที่ทำการตรวจวิเคราะห์ สารเคมีและน้ำยาเลี้ยงเซลล์ควรได้รับการตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนอยู่เสมอ ในขั้นตอนการปฏิสนธิควรใช้เทคนิค intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน DNA จากตัวสุจิ นอกจากนี้ยังควรกำจัดเซลล์ cumulus ที่อยู่รอบ ๆ ไข่ให้หมดก่อนการปฏิสนธิเพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน DNA จากมารดา การใช้เทคนิค nested PCR โดยนำ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่ครั้งแรกมาเป็นต้นแบบในปฏิกิริยาถูกโซ่ครั้งที่สองซึ่งใช้ primers อีกชุดหนึ่งที่ขยายได้ส่วนของ DNA ที่สั้นลงแต่อยู่ในส่วนของ DNA จากชั้นแรกสามารถช่วยลดปัญหาจากการปนเปื้อนได้ มีผู้ใช้เอ็นซายม์เพื่อย่อยสลาย DNA แปลกปลอมก่อนที่จะใส่เซลล์ที่ต้องการตรวจวินิจฉัย<sup>18</sup> อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อน DNA จากมารดายังเป็นปัญหาสำคัญที่ยังพบได้และเป็นสาเหตุของการวินิจฉัยผิดพลาด สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่มีลักษณะเด่น การปนเปื้อน DNA จากมารดาจะไม่ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาด แต่จะทำให้จำนวนของตัวอ่อนปกติที่สามารถใส่ในโพรงมดลูกได้ลดลง สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่มีลักษณะด้อย (ได้แก่ โรคอัลฟาและบีต้าธาลัสซีเมียในประเทศไทย) การปนเปื้อน DNA จากมารดาที่เป็นพันธุ์ทางในเซลล์ที่เป็นโรคพันธุ์แท้ จะทำให้การวินิจฉัยสรุปว่าตัวอ่อนนั้นเป็นพันธุ์ทาง (แฝง) และเลือกตัวอ่อนที่เป็นโรคดังกล่าวใส่ในโพรงมดลูก การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ DNA fingerprinting ร่วมด้วย จะช่วยบอกได้ว่ามี DNA ปนเปื้อนหรือไม่ และป้องกันการวินิจฉัยผิดพลาดได้<sup>3</sup>

### บทสรุป

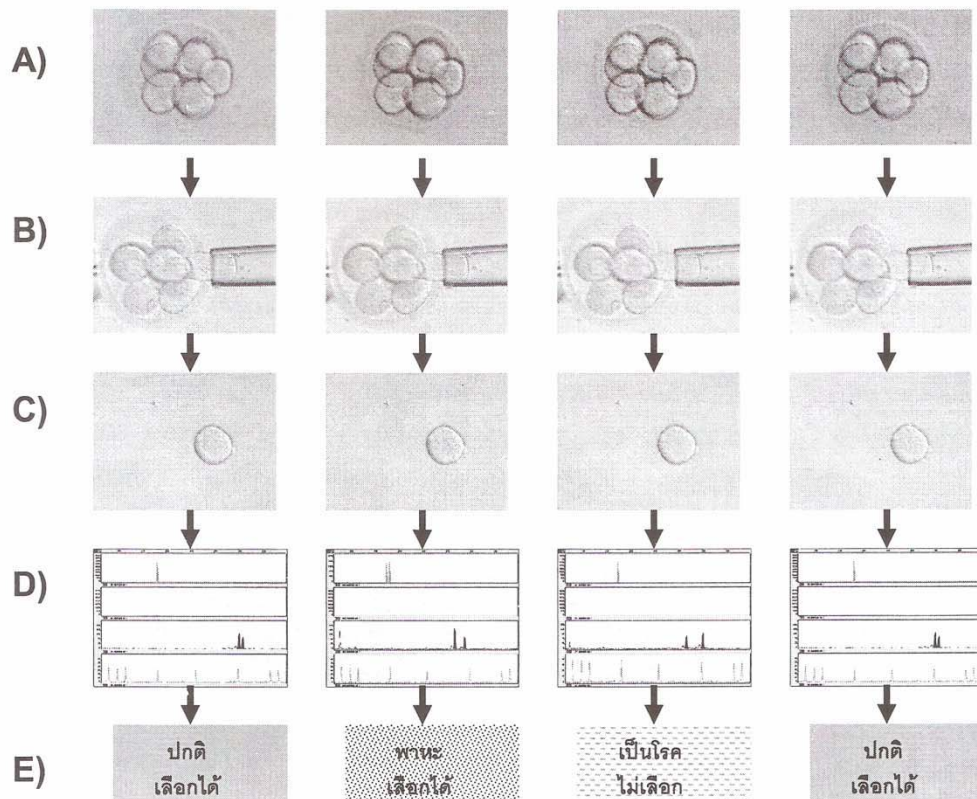
โดยสรุป การทำ PGD หรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งคร่ำครวญโดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมีข้อผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่าและไม่ผิดจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

สถานการณ์ในประเทศไทย โดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สภาวิจัย (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), บริษัท เอไซ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด และบริษัท เซริง ฟลาว ออร์กานอน (ประเทศไทย) จำกัด หัวหน้าโครงการฯ รศ.ดร.นพ.วิรัชชัย ปิยะมงคล และรศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช ได้ริเริ่มให้บริการการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมีย โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทำการเพาะขยายคลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 น้ำหนักแรกคลอด 2,900 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียีนผิดปกติของโรคธาลัสซีเมีย<sup>19</sup> ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นครั้งที่สองของโลก ได้ทำการเพาะขยายคลอดเมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2551 น้ำหนักแรกคลอด 3,280 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่เป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (Piyamongkol *et al.*, in preparation)

**รูปที่ 1** เทคนิคการดูเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (a) จับตัวอ่อนไว้หนึ่งโดย holding pipette ด้านซ้าย เจาะเปลือก zona pellucida ด้วยเลเซอร์ (b), (c) และ (d) เซลล์เดี่ยวถูกดูออกมาด้วยความระมัดระวังโดยใช้ biopsy pipette ผ่านทางช่องของเปลือก zona pellucida ที่เปิดเอาไว้ หัตถการนี้ทำโดย รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช



รูปที่ 2 การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (Embryo selection) สำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย A) ตัวอ่อนจากการทำทารกหลอดแก้วระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ, B) การดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนโดยเครื่องมือ micromanipulator, C) เซลล์เดี่ยวที่ได้จากตัวอ่อนแต่ละตัวเพื่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ, D) ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ชนิดเรืองแสง, E) เลือกตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคเพื่อใส่ในโพรงมดลูกของมารดาในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ การทำทารกหลอดแก้วและการดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนทำโดย รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล



#### Reference List

1. Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum.Genet.* 1998;**102**:117-23.
2. Conn CM, Cozzi J, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis for couples at high risk of Down syndrome pregnancy owing to parental translocation or mosaicism. *J.Med.Genet.* 1999;**36**:45-50.



3. Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD *et al.* A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat.Diagn.* 2001;**21**:223-32.
4. Piyamongkol W, Harper JC, Delhanty JD, Wells D. Preimplantation genetic diagnostic protocols for alpha- and beta-thalassaemias using multiplex fluorescent PCR. *Prenat.Diagn.* 2001;**21**:753-9.
5. Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J.Assist.Reprod.Genet.* 1998;**15**:140-4.
6. Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M *et al.* Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat.Diagn.* 1998;**18**:1427-36.
7. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;**344**:768-70.
8. Wells D, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Mol.Med.Today (Trends Mol.Med.)* 2001;**7**:23-30.
9. Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L *et al.* ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum.Reprod.* 2005;**20**:19-34.
10. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989;**1**:347-9.
11. Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum.Reprod.* 1995;**10**:1014-20.
12. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group. *Fertil.Steril.* 1996;**66**:126-9.
13. Muggleton Harris AL, Glazier AM, Pickering S, Wall M. Genetic diagnosis using polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. *Hum.Reprod.* 1995;**10**:183-92.
14. Handyside AH, Delhanty JDA. Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease. In Edwards RG, ed. *Preimplantation diagnosis of human genetic disease*, pp 239-70. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

15. Munne S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L *et al.* Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat.Diagn.* 1998;**18**:1459-66.
16. Ray PF, Handyside AH. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol.Hum.Reprod.* 1996;**2**:213-8.
17. Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol.Hum.Reprod.* 2003;**9**:411-20.
18. Sermon K, Lissens W, Joris H, Seneca S, Desmyttere S, Devroey P *et al.* Clinical application of preimplantation diagnosis for myotonic dystrophy. *Prenat.Diagn.* 1997;**17**:925-32.
19. Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Wells D, Kunaviktikul C, Tongsong T *et al.* A successful strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis of beta-thalassemia and simultaneous detection of Down's syndrome using multiplex fluorescent PCR. *J.Med.Assoc.Thai* 2006;**89**:918-27.

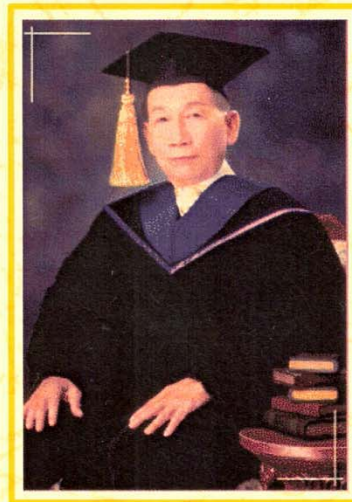


## การประชุมวิชาการ

ศ.เกียรติคุณ ดร.นพ.ปัญจะ กุลพงษ์



ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา  
2552



จัดโดย คณะอาจารย์แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**12 - 14 พฤษภาคม 2552**





## การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว (Preimplantation Genetic Diagnosis)

รศ.ดร.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล

ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว (Preimplantation genetic diagnosis, PGD)

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (embryo selection) เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มารดาที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปลอดโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis, PND) พบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งหรือภาวะทารกพิการอื่นเนื่องมาจากหัตถการในการวินิจฉัยก่อนคลอด การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นวิธีการการเกิดผู้ปวยรายใหม่ที่ไม่ขัดต่อจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

โดยทั่วไปแล้ว ข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวเหมือนกันกับการวินิจฉัยก่อนคลอด คือใช้ในการวินิจฉัยโรคร้ายแรง ซึ่งได้แก่ความผิดปกติของโครโมโซมทั้งแบบจำนวนนับและแบบ translocation (Conn *et al.*, 1998) และโรคพันธุกรรมยีนเดี่ยว (Piyamongkol *et al.*, 2001b) การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นประโยชน์กับครอบครัวหรือกลุ่มศาสนาที่ต้องการมีบุตรที่ปราศจากโรคพันธุกรรมแต่ไม่ต้องการการทำแท้งบุตร แม้ว่าตามกฎหมายของเมนเดล ความเสี่ยงที่ครอบครัวจะมีทารกผิดปกติสำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนด้อย (ได้แก่ อัลฟาและบีต้าธาลัสซีเมียในประเทศไทย) ในแต่ละครรภ์มีเพียงร้อยละ 25 แต่ก็มีความเสี่ยงที่ตรวจพบว่าทารกมีความผิดปกติร้ายแรงในโรคพันธุกรรมดังกล่าวและต้องทำแท้งบุตรติดต่อกันถึง 4 ครรภ์ โดยยังไม่เคยมีทารกปกติเลย การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นทางเลือกสำหรับครอบครัวดังกล่าวที่จะให้โอกาสเริ่มต้นการตั้งครรภ์โดยมีทารกที่ปราศจากโรค ไม่ต้องทนทุกข์ทรมานจากการทำแท้งบุตรอีกต่อไป นอกจากนี้ โดยปกติแล้วโรคพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดมะเร็งร้ายแรงหรือโรคร้ายแรงที่แสดงอาการเมื่ออายุ 30-50 ปี (ได้แก่ familial adenomatous polyposis coli, FAPC และ Huntington's chorea) ไม่ถือเป็นข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนคลอดและการทำแท้งบุตร อย่างไรก็ตามโรคพันธุกรรมดังกล่าวเป็นโรคร้ายแรง

ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา 2552

ระหว่างวันที่ 12-14 พฤษภาคม 2552

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่ครอบครัวไม่ต้องการให้สมาชิกในครอบครัวประสบเคราะห์กรรมอีก การคัดเลือกตัวอ่อนที่ปราศจากพันธุกรรมผิดปกติดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกที่ยอมรับกันได้มากกว่าการวินิจฉัยก่อนคลอด (Ao *et al.*, 1998; Sermon *et al.*, 1998) นอกจากนี้ คู่สมรสที่มีบุตรยากหรือประสบปัญหาแท้งบุตรซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยมีสาเหตุเนื่องมาจากมีความผิดปกติของโครโมโซมชนิด translocation แฝงอยู่สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนปกติเพื่อใส่ในโพรงมดลูก และตั้งครรภ์โดยมีทารกปกติได้

การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Alan Handyside ชาวอังกฤษเป็นผู้ค้นพบเซลล์ blastomere จากตัวอ่อนระยะ cleavage ซึ่งมี 8-10 เซลล์ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจวินิจฉัยเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซมเพศโดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ที่โรงพยาบาล Hammersmith กรุงลอนดอน (Handyside *et al.*, 1990) ต่อมาก็ได้มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสมัยใหม่ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridisation (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นจำนวนนับและที่เป็น translocation และใช้ในการตรวจเพศของตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดบนโครโมโซมเพศ (ส่วนใหญ่เป็น X-linked recessive) ส่วนโรคพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) (Wells and Delhanty, 2001)

#### การตัดตรวจเซลล์ที่ระยะ 8-10 เซลล์ (Cleavage stage embryo biopsy)

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ เทคนิคการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การตัดตรวจเซลล์ระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy) (Sermon *et al.*, 2005) กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว โดยใช้สารละลาย acid Tyrodes หรือลำแสงเลเซอร์ หรือใช้เข็มของปลาย pipette ตัด แล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม (Handyside *et al.*, 1989) ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก



### การตัดตรวจโพลาร์บอดี (Polar body biopsy)

เทคนิคอื่นที่มีผู้ใช้ในการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ การตัดตรวจ polar body (Munne *et al.*, 1995; Verlinsky *et al.*, 1992) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่แยกออกมาจากไข่ (oocyte) ในการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และจะสลายไป บางคนจึงเรียกวิธีนี้ว่าเป็น preconception diagnosis ข้อดีของเทคนิคการตรวจนี้ ได้แก่ การตรวจโดยวิธีนี้ไม่สามารถทำนายยีนที่จะมาจากตัวสุจิได้ จึงไม่สามารถใช้ในการเลือกเพศตัวอ่อนได้ และไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเด่นที่บิดาเป็นพาหะได้ สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนด้อย แม้ไข่บางฟองที่มียีนที่ผิดปกติ แต่มีโอกาสร้อยละ 50 ที่จะปฏิสนธิกับตัวสุจิที่มียีนปกติ และให้กำเนิดตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคร้ายแรงได้ วิธีการตรวจนี้จึงทำให้สูญเสียไข่ดังกล่าวไปถึงครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้เทคนิคการตรวจนี้ยังไม่สามารถทำนายความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นหลังการปฏิสนธิได้ ได้แก่ ภาวะ mosaicism ตัวอ่อนที่เกิดจากไขดังกล่าวจึงยังมีความเสี่ยงที่จะมีความผิดปกติอยู่

### การตัดตรวจเซลล์ระยะบลาสโตซิส (Blastocyst biopsy)

การตัดตรวจเซลล์ตัวอ่อนที่ระยะ blastocyst (Muggleton Harris *et al.*, 1995) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวได้ ในวันที่ 6-7 หลังการปฏิสนธิ ตัวอ่อนจะอยู่ในระยะ blastocyst ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 120 เซลล์ มีการแยกเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด คือ inner cell mass ซึ่งจะเจริญไปเป็นตัวอ่อน และ trophectoderm ซึ่งจะเจริญไปเป็นรกและถุงน้ำ เมื่อเจาะรูที่ zona pellucida แล้วเลี้ยงตัวอ่อนต่อไป เซลล์ trophectoderm บางส่วนจะยื่นออกมาจากรูดังกล่าว สามารถตัดเซลล์ดังกล่าวไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ถึง 10-30 เซลล์ ทำให้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคกระทำได้ง่ายขึ้นมากกว่าการตรวจวิเคราะห์จากเซลล์เดียว อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อด้อยที่ผลการตรวจกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นรอกอาจมีความลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน (ภาวะ mosaicism) และการเลี้ยงตัวอ่อนในตู้ต่อไปจนถึงระยะ blastocyst ทำให้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีพอที่จะใส่ในโพรงมดลูกได้เหลือน้อยลง เมื่อเทคนิคการเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst มีประสิทธิภาพมากขึ้น เชื่อว่าการตัดตรวจเซลล์ที่ระยะนี้อาจจะเป็นที่นิยมมากขึ้น

### Fluorescent in situ hybridisation (FISH)

ในระยะแรกมีผู้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคพันธุกรรมที่อยู่นบนโครโมโซมเพศ (Handyside *et al.*, 1989) แต่ต่อมาพบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนอาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Handyside and Delhanty, 1993) เนื่องจากปัญหาการตรวจ

ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา 2552

ระหว่างวันที่ 12-14 พฤษภาคม 2552

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขึ้นได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และเทคนิค PCR ไม่สามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ ในกรณีตัวอ่อนที่มีโครโมโซม 45,XO (Turner's syndrome) ซึ่งผลการตรวจโดยเทคนิค PCR จะเหมือนกันกับ 46,XX ก็มีความเสี่ยงที่จะมีโรคพันธุกรรมดังกล่าวเช่นเดียวกับทารกเพศชาย จึงมีผู้แนะนำให้ใช้เทคนิค FISH ในการตรวจเลือกเพศตัวอ่อน ซึ่งสามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ และไม่มีปัญหา ADO ทำให้การวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้น

### ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดียว (Single cell PCR)

การตรวจวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยเทคนิค PCR ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน (mutation) ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ ปัญหาสำคัญในการวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดียวได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplification failure, AF) ปัญหาการตรวจขึ้นได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ปัญหา AF อาจเกิดจากการที่เซลล์ดังกล่าวอาจไม่มีนิวเคลียสหรืออยู่ในระหว่างการย่อยสลาย บางครั้งเซลล์ที่ต้องการตรวจอาจหล่นหายไปในช่วงการนำใส่ลงในหลอดวิเคราะห์ นอกจากนี้ ส่วนผสมของสารละลายและโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ก็อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของ PCR (Piyamongkol *et al.*, 2003)

ปัญหา ADO คือการตรวจไม่พบยีนใดยีนหนึ่ง (allele) ของสองยีนในเซลล์พันธุ์ทาง (heterozygote) ทำให้การวินิจฉัยสรุปผลผิดว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์พันธุ์แท้ (homozygote) โดยทั่วไปแล้วปัญหา ADO พบได้ประมาณร้อยละ 2-20 (Ray and Handyside, 1996) สาเหตุที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีผู้ตั้งสมมุติฐานว่าปัญหานี้ อาจเกิดจากการที่ DNA เริ่มย่อยสลาย การเข้าถึงส่วนของ DNA ที่ต้องการตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ได้ และเทคนิคการย่อยเซลล์ที่แตกต่างกัน มีผู้พยายามลดอุบัติการณ์ของปัญหานี้โดยแนะนำเทคนิค fluorescent PCR (F-PCR), การเพิ่มอุณหภูมิ denaturation ในปฏิกิริยาลูกโซ่ และการใช้น้ำย่อยเซลล์ชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี linkage analysis ร่วมด้วย และการสรุปผลการวินิจฉัยจากสองเซลล์สำหรับแต่ละตัวอ่อน จะช่วยลดความเสี่ยงที่จะวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001a)

ปัญหาการปนเปื้อนเป็นปัญหาใหญ่อีกปัญหาหนึ่งในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดียว สามารถป้องกันการปนเปื้อน DNA จากสิ่งแวดล้อมได้โดยการเตรียมการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ในห้องแยกพิเศษที่สะอาดและอยู่ห่างจากบริเวณที่ทำการตรวจวิเคราะห์ สารเคมีและน้ำยาเลี้ยงเซลล์ควร

ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โลหิตวิทยา 2552

ระหว่างวันที่ 12-14 พฤษภาคม 2552

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ได้รับการตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนอยู่เสมอ ในขั้นตอนการปฏิสนธิควรใช้เทคนิค intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน DNA จากตัวอสุจิ นอกจากนี้ยังควรกำจัดเซลล์ cumulus ที่อยู่รอบ ๆ ไข่ให้หมดก่อนการปฏิสนธิเพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน DNA จากมารดา การใช้เทคนิค nested PCR โดยนำ DNA ที่ได้จากปฏิกริยาลูกโซ่ครั้งแรกมาเป็นต้นแบบในปฏิกริยาลูกโซ่ครั้งที่สองซึ่งใช้ primers อีกชุดหนึ่งที่ขยายได้ส่วนของ DNA ที่สั้นลงแต่อยู่ในส่วนของ DNA จากชั้นแรกสามารถช่วยลดปัญหาจากการปนเปื้อนได้ มีผู้ใช้เอ็นซายม์เพื่อย่อยสลาย DNA แปลกปลอมก่อนที่จะใส่เซลล์ที่ต้องการตรวจวินิจฉัย (Sermon *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อน DNA จากมารดายังเป็นปัญหาสำคัญที่ยังพบได้และเป็นสาเหตุของการวินิจฉัยผิดพลาด สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวที่มีลักษณะเด่น การปนเปื้อน DNA จากมารดาจะไม่ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาด แต่จะทำให้จำนวนของตัวอ่อนปกติที่สามารถใส่ในโพรงมดลูกได้ลดลง สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวที่มีลักษณะด้อย (ได้แก่ โรคอัลฟาและบีตาธาลัสซีเมียในประเทศไทย) การปนเปื้อน DNA จากมารดาที่เป็นพันธุ์ทางในเซลล์ที่เป็นโรคพันธุ์แท้ จะทำให้การวินิจฉัยสรุปว่าตัวอ่อนนั้นเป็นพันธุ์ทาง (แฝง) และเลือกตัวอ่อนที่เป็นโรคดังกล่าวใส่ในโพรงมดลูก การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ DNA fingerprinting ร่วมด้วย จะช่วยบอกได้ว่ามี DNA ปนเปื้อนหรือไม่ และป้องกันการวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001b)

### บทสรุป

โดยสรุป การตรวจ PGD หรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครบกี้ โดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมียืนผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่าและไม่ผิดจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย สถานการณ์ในประเทศไทย โดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สภาวิจัย (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), บริษัท เอไอ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด และบริษัท เซริง พลาว ออร์กานอน (ประเทศไทย) จำกัด หัวหน้าโครงการฯ รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล และรศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช ได้ริเริ่มให้บริการการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคบีตาธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้น

ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา 2552

ระหว่างวันที่ 12-14 พฤษภาคม 2552

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทำการเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 น้ำหนักแรกคลอด 2,900 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียีนผิดปกติของฟีตาธาลัสซีเมีย (Piyamongkol *et al.*, 2006) ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นครั้งที่สองของโลก ได้ทำการเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2551 น้ำหนักแรกคลอด 3,280 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (Piyamongkol *et al.*, in preparation)

### เอกสารอ้างอิง

- Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* **15**: 140-144.
- Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet* **102**: 117-123.
- Handyside AH, Delhanty JDA. 1993. Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease. In: Edwards RG, ed. *Preimplantation diagnosis of human genetic disease*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 239-270.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **344**: 768-770.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* **1**: 347-349.
- Muggleton Harris AL, Glazier AM, Pickering S, Wall M. 1995. Genetic diagnosis using polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. *Hum Reprod* **10**: 183-192.

ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา 2552

ระหว่างวันที่ 12-14 พฤษภาคม 2552

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. 1995. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* **10**: 1014-1020.
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **9**: 411-420.
- Piyamongkol W, Harper JC, Delhanty JD, Wells D. 2001a. Preimplantation genetic diagnostic protocols for alpha- and beta-thalassaemias using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* **21**: 753-759.
- Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, *et al.* 2001b. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* **21**: 223-232.
- Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Wells D, Kunaviktikul C, Tongsong T, *et al.* 2006. A successful strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis of beta-thalassemia and simultaneous detection of Down's syndrome using multiplex fluorescent PCR. *J Med Assoc Thai* **89**: 918-927.
- Ray PF, Handyside AH. 1996. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **2**: 213-218.
- Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, *et al.* 1998. Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat Diagn* **18**: 1427-1436.
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, *et al.* 2005. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* **20**: 19-34.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, *et al.* 1992. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* **12**: 103-110.
- Wells D, Delhanty JD. 2001. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Mol Med Today (Trends Mol Med)* **7**: 23-30.



สมาคมอนามัยเจริญพันธุ์ (ไทย)

ร่วมกับ

ชมรมเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์แห่งประเทศไทย

การประชุมวิชาการประจำปี 2552

# Theme: **Happy Sex and Reproduction**

วันที่ 18-19 มิถุนายน 2552

โรงแรมมณเฑียร สุรวงศ์ กรุงเทพฯ

(สถานีรถไฟฟ้าใต้ดินสามย่าน)



## การวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมระยะก่อนการฝังตัว

### Preimplantation Genetic Diagnosis

รองศาสตราจารย์ ดร. นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล

ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่

#### การวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมระยะก่อนการฝังตัว (Preimplantation genetic diagnosis)

การวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (embryo selection) เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มารดาที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปลอดโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่เกิดผลการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis, PND) พบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งหรือภาวะทารกพิการอันเนื่องมาจากหัตถการในการวินิจฉัยก่อนคลอด การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นวิธีลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่ขัดต่อจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

โดยทั่วไปแล้ว ข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวใช้เช่นเดียวกันกับการวินิจฉัยก่อนคลอด คือใช้ในการวินิจฉัยโรคร้ายแรง ซึ่งได้แก่ความผิดปกติของโครโมโซมทั้งแบบจำนวนนับและแบบ translocation (Conn *et al.*, 1998) และโรคพันธุกรรมยีนเดี่ยว (Piyamongkol *et al.*, 2001b) การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นประโยชน์กับครอบครัวหรือกลุ่มศาสนาที่ต้องการมีบุตรที่ปราศจากโรคพันธุกรรมแต่ไม่ต้องการทำแท้งบุตร แม้ว่าตามกฎหมายของเม็กซิโก ความเสี่ยงที่ครอบครัวจะมีทารกผิดปกติสำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนด้อย (ได้แก่ อัลฟาและบีตาธาลัสซีเมียในประเทศไทย) ในแต่ละครรภ์มีเพียงร้อยละ 25 แต่ก็มีบางครอบครัวที่ตรวจพบว่าทารกมีความผิดปกติร้ายแรงในโรคพันธุกรรมดังกล่าวและต้องทำแท้งบุตรติดต่อกันถึง 4 ครรภ์ โดยยังไม่เคยมีทารกปกติเลย การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นทางเลือกสำหรับครอบครัวดังกล่าวที่จะให้โอกาสเริ่มต้นการตั้งครรภ์โดยมีทารกที่ปราศจากโรค ไม่ต้องทนทุกข์ทรมานจากการทำแท้งบุตรอีกต่อไป นอกจากนี้ โดยปกติแล้วโรคพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดมะเร็งร้ายแรงหรือโรคร้ายแรงที่แสดงอาการเมื่ออายุ 30-50 ปี (ได้แก่ familial adenomatous polyposis coli, FAPC และ Huntington's chorea) ไม่ถือเป็นข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยก่อนคลอดและการทำแท้งบุตร อย่างไรก็ตามโรคพันธุกรรมดังกล่าวเป็นโรคร้ายแรงที่ครอบครัวไม่ต้องการให้สมาชิกในครอบครัวประสบเคราะห์กรรมอีก การคัดเลือกตัวอ่อนที่ปราศจากพันธุกรรมผิดปกติดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกที่ยอมรับกันได้มากกว่าการวินิจฉัยก่อนคลอด (Ao *et al.*, 1998; Sermon *et al.*, 1998) นอกจากนี้ คู่สมรสที่มีบุตรยากหรือประสบปัญหาแท้งบุตรซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยมีสาเหตุเนื่องมาจาก

มีความผิดปกติของโครโมโซมชนิด translocation แฝงอยู่ สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนปกติเพื่อใส่ในโพรงมดลูก และตั้งครรภ์โดยมีทารกปกติได้

การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Alan Handyside ชาวอังกฤษเป็นผู้ตัดเซลล์ blastomere จากตัวอ่อนระยะ cleavage ซึ่งมี 8-10 เซลล์ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจวินิจฉัยเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซมเพศโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ที่โรงพยาบาล Hammersmith กรุงลอนดอน (Handyside *et al.*, 1990) ต่อมาก็ได้มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสสมัยใหม่ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridisation (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นจำนวนนับและที่เป็น translocation และใช้ในการตรวจเพศของตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดบนโครโมโซมเพศ (ส่วนใหญ่เป็น X-linked recessive) ส่วนโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) (Wells and Delhanty, 2001) (รูปที่ 1)

#### การตัดตรวจเซลล์บลาสโตเมียที่ระยะ 8-10 เซลล์ (Cleavage stage embryo biopsy)

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ เทคนิคการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การตัดตรวจเซลล์ระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy) (Sermon *et al.*, 2005) กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว โดยใช้สารละลาย acid Tyrodes หรือลำแสงเลเซอร์ หรือใช้คมของปลาย pipette ตัด แล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม (Handyside *et al.*, 1989) ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก

#### การตัดตรวจโพลาร์บอดี (Polar body biopsy)

เทคนิคอื่นที่มีผู้ใช้ในการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ การตัดตรวจ polar body (Munne *et al.*, 1995; Verlinsky *et al.*, 1992) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่แยกออกมาจากไข่ (oocyte) ในการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และจะสลายไป บางคนจึงเรียกวิธีนี้ว่าเป็น preconception diagnosis ข้อด้อยของเทคนิคการตรวจนี้ได้แก่ การตรวจโดยวิธีนี้ไม่สามารถทำนายยีนที่จะมาจากตัวสุจิได้ จึงไม่สามารถใช้ในการเลือกเพศตัวอ่อนได้ และไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเด่นที่บิดาเป็นพาหะได้ สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนด้อย แม้ไข่บางฟองที่มียีนที่ผิดปกติ แต่มีโอกาสร้อยละ 50 ที่จะปฏิสนธิกับตัวสุจิที่มียีน

ปกติ และให้กำเนิดตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคร้ายแรงได้ วิธีการตรวจนี้จึงทำให้สูญเสียไข่ดังกล่าวไปถึงครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้ เทคนิคการตรวจนี้ยังไม่สามารถทำนายความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นหลังการปฏิสนธิได้ ได้แก่ ภาวะ mosaicism ตัวอ่อนที่เกิดจากไข่ดังกล่าวจึงยังมีความเสี่ยงที่จะมีความผิดปกติอยู่

#### การตัดตรวจเซลล์ระยะบลาสโตซิส (Blastocyst biopsy)

การตัดตรวจเซลล์ตัวอ่อนที่ระยะ blastocyst (Muggleton Harris *et al.*, 1995) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวได้ ในวันที่ 6-7 หลังการปฏิสนธิ ตัวอ่อนจะอยู่ในระยะ blastocyst ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 120 เซลล์ มีการแยกเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด คือ inner cell mass ซึ่งจะเจริญไปเป็นตัวอ่อนกับ yolk sac และ trophectoderm ซึ่งจะเจริญไปเป็นรกและถุงน้ำ เมื่อเจาะรูที่ zona pellucida แล้วเลี้ยงตัวอ่อนต่อไป เซลล์ trophectoderm บางส่วนจะยื่นออกมาจากรูดังกล่าว สามารถตัดเซลล์ดังกล่าวไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ถึง 10-30 เซลล์ ทำให้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคกระทำได้ง่ายขึ้นมากกว่าการตรวจวิเคราะห์จากเซลล์เดียว อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อด้อยที่ผลการตรวจกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นรกออาจมีความลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน (ภาวะ mosaicism) และการเลี้ยงตัวอ่อนในตู้ต่อไปจนถึงระยะ blastocyst ทำให้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีพอที่จะใส่ในโพรงมดลูกได้เหลือน้อยลง เมื่อเทคนิคการเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst มีประสิทธิภาพมากขึ้น เชื่อว่าการตัดตรวจเซลล์ที่ระยะนี้อาจจะเป็นที่นิยมมากขึ้น

#### Fluorescent in situ hybridisation (FISH)

ในระยะแรกมีผู้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมเพศ (Handyside *et al.*, 1989) แต่ต่อมาพบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนอาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Handyside and Delhanty, 1993) เนื่องจากปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และเทคนิค PCR ไม่สามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ ในกรณีตัวอ่อนที่มีโครโมโซม 45,XO (Turner's syndrome) ซึ่งผลการตรวจโดยเทคนิค PCR จะเหมือนกันกับ 46,XX ก็มีความเสี่ยงที่จะมีโรคพันธุกรรมดังกล่าวเช่นเดียวกับทารกเพศชาย จึงมีผู้แนะนำให้ใช้เทคนิค FISH ในการตรวจเลือกเพศตัวอ่อน ซึ่งสามารถบอกจำนวนของโครโมโซม X ได้ และไม่มีปัญหา ADO ทำให้การวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้น ปัญหาที่อาจทำให้การวินิจฉัยโดยเทคนิค FISH ผิดพลาด ได้แก่ การซ้อนทับกันของโครโมโซมที่ตรวจ ประสิทธิภาพในการ hybridisation ของ FISH probe ซึ่งอาจลดลงเมื่อใช้ probe สำหรับหลายโครโมโซมร่วมกันในการตรวจครั้งเดียวกัน ความผิดปกติชนิด mosaicism ซึ่งมีเซลล์ที่มีลักษณะของโครโมโซมแตกต่างกันมากกว่าหนึ่งแบบในตัวอ่อนเดียวกัน การตรวจสอบเซลล์จากแต่ละตัวอ่อนจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการวินิจฉัยผิดพลาดจากสาเหตุดังกล่าวลงได้



### ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยว (Single cell PCR)

การตรวจวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยเทคนิค PCR ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน (mutation) ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ ปัญหาสำคัญในการวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยวได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplification failure, AF) ปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ปัญหา AF อาจเกิดจากการที่เซลล์ดังกล่าวอาจไม่มีนิวเคลียสหรืออยู่ในระหว่างการย่อยสลาย บางครั้งเซลล์ที่ต้องการตรวจอาจหล่นหายไปในช่วงการนำใส่ลงในหลอดวิเคราะห์ นอกจากนี้ ส่วนผสมของสารละลายและโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ก็อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของ PCR (Piyamongkol *et al.*, 2003)

ปัญหา ADO คือการตรวจไม่พบยีนใดยีนหนึ่ง (allele) ของสองยีนในเซลล์พันธุ์ทาง (heterozygote) ทำให้การวินิจฉัยสรุปผลผิดว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์พันธุ์แท้ (homozygote) โดยทั่วไปแล้วปัญหา ADO พบได้ประมาณร้อยละ 2-20 (Ray and Handyside, 1996) สาเหตุที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีผู้ตั้งสมมุติฐานว่าปัญหานี้อาจเกิดจากการที่ DNA เริ่มย่อยสลาย การเข้าถึงส่วนของ DNA ที่ต้องการตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ไม่ดี และเทคนิคการย่อยเซลล์ที่แตกต่างกัน มีผู้พยายามลดอุบัติการณ์ของปัญหานี้โดยแนะนำเทคนิค fluorescent PCR (F-PCR), การเพิ่มอุณหภูมิ denaturation ในปฏิกิริยาลูกโซ่ และการใช้น้ำยาย่อยเซลล์ชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี linkage analysis ร่วมด้วย และการสรุปผลการวินิจฉัยจากสองเซลล์สำหรับแต่ละตัวอ่อน จะช่วยลดความเสี่ยงที่จะวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001a)

ปัญหาการปนเปื้อนเป็นปัญหาใหญ่อีกปัญหาหนึ่งในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยว สามารถป้องกันการปนเปื้อน DNA จากสิ่งแวดล้อมได้โดยการเตรียมการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ในห้องแยกพิเศษที่สะอาดและอยู่ต่างที่กับบริเวณที่ทำการตรวจวิเคราะห์ สารเคมีและน้ำยาเลี้ยงเซลล์ควรได้รับการตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนอยู่เสมอ ในขั้นตอนการปฏิสนธิควรใช้เทคนิค intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน DNA จากตัวอสุจิ นอกจากนี้ยังควรกำจัดเซลล์ cumulus ที่อยู่รอบ ๆ ไข่ให้หมดก่อนการปฏิสนธิเพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน DNA จากมารดา การใช้เทคนิค nested PCR โดยนำ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ครั้งแรกมาเป็นต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่ครั้งที่สองซึ่งใช้ primers อีกชุดหนึ่งที่ขยายได้ส่วนของ DNA ที่สั้นลงแต่อยู่ในส่วนของ DNA จากชั้นแรกสามารถช่วยลดปัญหาจากการปนเปื้อนได้ มีผู้ใช้เอ็นซายม์เพื่อย่อยสลาย DNA แปลงปลอมก่อนที่จะใส่เซลล์ที่ต้องการตรวจวินิจฉัย (Sermon *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อน DNA จากมารดายังเป็นปัญหาสำคัญที่ยังพบได้และเป็นสาเหตุของการวินิจฉัยผิดพลาด สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่มีลักษณะเด่น การปนเปื้อน DNA จากมารดาจะไม่ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาด

แต่จะทำให้จำนวนของตัวอ่อนปกติที่สามารถใส่ในโพรงมดลูกได้ลดลง สำหรับโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่มีลักษณะด้อย (ได้แก่ โรคอัลฟาและบีต้าธาลัสซีเมียในประเทศไทย) การปนเปื้อน DNA จากมารดาที่เป็นพันธุ์ทางในเซลล์ที่เป็นโรคพันธุ์แท้ จะทำให้การวินิจฉัยสรุปว่าตัวอ่อนนั้นเป็นพันธุ์ทาง (แฝง) และเลือกตัวอ่อนที่เป็นโรคดังกล่าวใส่ในโพรงมดลูก การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ DNA fingerprinting ร่วมด้วย จะช่วยบอกได้ว่ามี DNA ปนเปื้อนหรือไม่ และป้องกันการใช้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001b)

### บทสรุป

โดยสรุป การตรวจ PGD หรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครรรภ์โดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบเทียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่เกิดการตรวจพบว่าทารกมียืนผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่าและไม่ผิดจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย สถานการณ์ในประเทศไทยโดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สภาวิจัย (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), บริษัท เอไซ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด และบริษัท เซริง พลาว ออร์กานอน (ประเทศไทย) จำกัด หัวหน้าโครงการฯ รศ. ดร. นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล และ รศ.นพ. ชีระพร วุฒยวนิช ได้ริเริ่มให้บริการการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคบีต้าธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทารกเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 น้ำหนักแรกคลอด 2,900 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียืนผิดปกติของบีต้าธาลัสซีเมีย (Piyamongkol *et al.*, 2006) ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นครั้งที่สองของโลก ได้ทารกเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2551 น้ำหนักแรกคลอด 3,280 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่เป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (Piyamongkol *et al.*, in preparation)

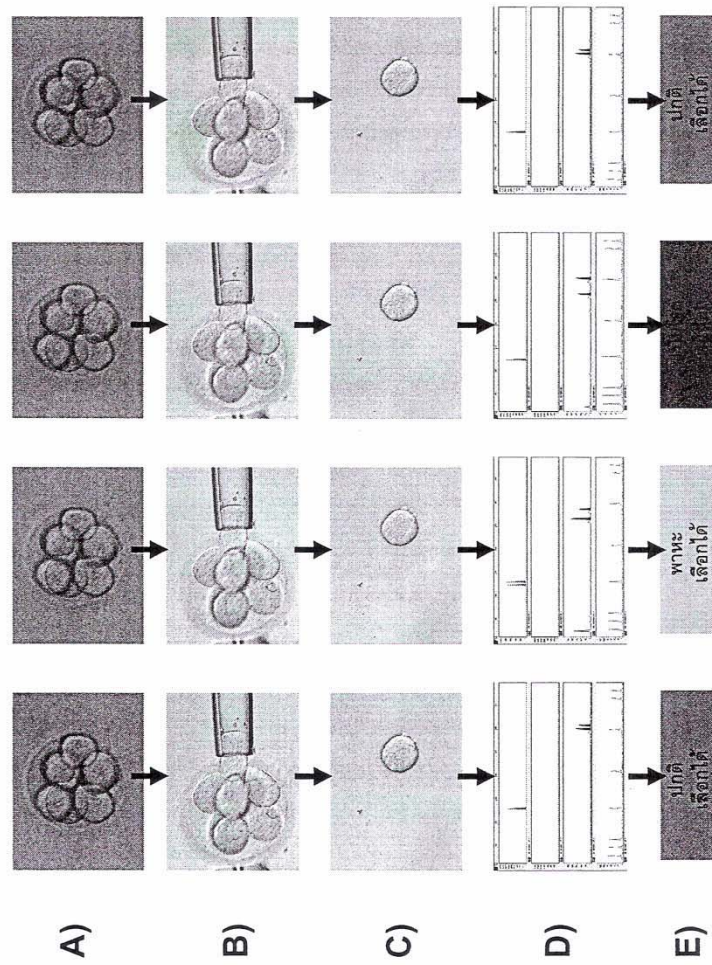


### References

- Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* **15**: 140-144.
- Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet* **102**: 117-123.
- Handyside AH, Delhanty JDA. 1993. Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease. In: Edwards RG, ed. *Preimplantation diagnosis of human genetic disease*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 239-270.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **344**: 768-770.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* **1**: 347-349.
- Muggleton Harris AL, Glazier AM, Pickering S, Wall M. 1995. Genetic diagnosis using polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. *Hum Reprod* **10**: 183-192.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. 1995. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* **10**: 1014-1020.
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **9**: 411-420.
- Piyamongkol W, Harper JC, Delhanty JD, Wells D. 2001a. Preimplantation genetic diagnostic protocols for alpha- and beta-thalassaemias using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* **21**: 753-759.
- Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, *et al.* 2001b. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* **21**: 223-232.

- Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Wells D, Kunaviktikul C, Tongsong T, *et al.* 2006. A successful strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis of beta-thalassemia and simultaneous detection of Down's syndrome using multiplex fluorescent PCR. *J Med Assoc Thai* **89**: 918-927.
- Ray PF, Handyside AH. 1996. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **2**: 213-218.
- Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, *et al.* 1998. Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat Diagn* **18**: 1427-1436.
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, *et al.* 2005. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* **20**: 19-34.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, *et al.* 1992. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* **12**: 103-110.
- Wells D, Delhanty JD. 2001. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Mol Med Today (Trends Mol Med)* **7**: 23-30.

รูปที่ 1: การวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมระยะก่อนการฝังตัว (Preimplantation diagnosis of genetic diseases, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (Embryo selection) สำหรับโรคมีด้าลัสซูเมีย A) ตัวอ่อนจากการทำทารกหลอดแก้วระยะวันที่ 3 หลังปฏิสนธิ, B) การดูดเซลล์สืบลาสต์โดยเครื่องมือ micromanipulator, C) เซลล์สืบลาสต์เดี่ยวที่ได้จากตัวอ่อนแต่ละตัวเพื่อการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ, D) ผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ชนิดเรืองแสง, E) เลือกตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคเพื่อใส่ในโพรงมดลูกของมารดาในวันที่ 4 หลังปฏิสนธิ การทำทารกหลอดแก้วและการดูดเซลล์สืบลาสต์เดี่ยวจากตัวอ่อนทำโดย รศ.นพ. วีระพร วุฒยวณิช การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยวโดย รศ.ดร.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล



## ภาคผนวก 3

การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการฯ

โดยสื่อมวลชนในรูปแบบสิ่งพิมพ์

เนื่องในวันธาลัสซีเมียโลก

8 พฤษภาคม 2551



Audit Bureau  
of Circulation  
**ABC**  
APPROVED  
Thailand's  
only  
audited  
circulation  
newspaper

THE NEWSPAPER YOU CAN TRUST

# Bangkok Post

www.bangkokpost.com

MAY 11, 2008 • 25 BAHT



First Motor Sales (Thailand) Ltd. Tel: 0-2909-9927  
First Motor Manufacturing (Thailand) Ltd. Tel: 0-2249-2000

SUNDAY

## Perspective



## Storm warning

Burma's Cyclone Nargis is a lesson in why people should be prepared for natural disasters. **12**

## International

Tsvangirai to join Zimbabwe run-off poll **6**

## Markets

AIG, oil drag down Wall St **4**

## Outlook

## A medical miracle

New 'da Vinci' technology a godsend for cancer patients. **01**



**Sports** See our 16-page tabloid for the latest action

## Surayud to fly to Burma to negotiate

Trip aimed at convincing generals to take aid

BANGKOK POST AND OPA

Privy Councillor and former prime minister Surayud Chulanont and a six-member entourage will reportedly fly to Burma's new capital Naypyidaw today in an effort to convince the ruling junta to accept humanitarian aid for cyclone victims.

Foreign Minister Noppadon Pattama was reported to have told reporters in Japan that one of the missions of Gen Surayud's delegation was to convince the Burmese government to accept humanitarian aid from other countries and allow international aid workers into the cyclone-ravaged country.

Gen Surayud's entourage includes air force commander-in-chief ACM Chulit Pookpasuk and Raja Prachanukroh Foundation secretary-general Prasong Phitthunkijja. The foundation is under His Majesty the King's patronage.

They will also present aid packages provided by the King to the Burmese generals today. The King yesterday instructed the foundation to send 2,000 bags of utensils and bedding weighing 10 tonnes to Burma.

The 2,000 "subsistence" bags will be flown to Rangoon today at 8.30am on a Thai Air Force C-130 aircraft, foundation officials said.

Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn also ordered three electricity generators along with a second package of disaster relief aid to be sent to Burma yesterday.

The relief packages include 20 water purifiers and six boxes of water purifying tablets, 500 packs of basic commodities, 120 boxes of chocolate-malt powder, 63 large tents, 34 small tents and 300 pieces of plastic clothes.

The packages, prepared in cooperation between the air force, the Thai Red Cross and the Puen Pung (Phai) Yam Yak Volunteer Foundation, arrived in Rangoon at about 2.30pm yesterday.

Meanwhile, UN refugee agency UNHCR said its first trucks had arrived in Burma without a hitch yesterday, carrying 20 tons of emergency aid for survivors

of the cyclone. The trucks, with enough emergency material to provide shelter for up to 10,000 people, crossed over from Thailand at the Friendship Bridge border at Mae Sot. They carried plastic sheets and tents.

"This convoy marks a positive step in an aid effort so far marked by challenges and constraints," said Raymond Hall, the UNHCR's chief representative in Thailand.

"We hope it opens up a possible corridor to allow more international aid to reach the cyclone victims."

"What we are sending in by road is in addition to the supplies we have already procured locally in Yangon and the 100 tons of supplies we started airlifting today from Dubai."

The UNHCR also started airlifting 100 tons of shelter supplies, including 4,500 plastic sheets and 17,000 blankets, from its Dubai stockpile to Rangoon early yesterday.

The first 33 tons left on a World Food Programme aircraft with two other flights scheduled for early next week.

The refugee agency is focusing on providing emergency shelter for the cyclone victims in the Irrawaddy delta and parts of Rangoon, which were among the worst hit.

More than one million people are estimated to have lost their homes after the cyclone hit last week.

The UNHCR has already distributed US\$50,000 worth of shelter items bought locally in the aftermath of the storm.

The lorry convoy is expected to take about two days from the border to Rangoon in the south.

The supplies, raised by the UNHCR from its existing stockpiles normally intended for refugee camps scattered along the Thai-Burma border, will be distributed by UNHCR staff.

The UNHCR negotiated a concession for the border posts to stay open at the weekend to allow the convoys through. The UNHCR launched a \$187 million appeal for Burma on Friday which included \$6 million to provide 250,000 cyclone victims with shelter.



Burmese migrants Ti and Ario look at photographs of cyclone victims which a Burmese foreman printed off the internet. The couple's hometown is in the Irrawaddy delta, the hardest-hit area in Burma. (JET JARUS NA RANGON)

For Thailand's two million Burmese workers, finding out what's happened to their families in the areas hit by the cyclone is proving impossible

Story by  
KULTIDA SAMABUDHI  
SAMUT SAKHON

## THE PAIN OF NOT KNOWING

Not knowing the fate of loved ones is sometimes more painful than learning they have gone.

But that is the way many Burmese workers in Thailand feel. They have been kept in the dark about their families after Cyclone Nargis struck the Irrawaddy delta last week.

There are about two million Burmese migrants, both legal and illegal, working in Thailand.

Ti and Ario, a Burmese couple working at a footwear factory in Samut Sakhon province, have had many sleepless nights for a week so far.

"I really want to know if my family is still alive," said the 32-year-old Ti, staring hopelessly at pictures of dead bodies scattered in a paddy field her foreman printed from the internet.

The couple have been working in Thailand for two years. Like most of the estimated 300,000 Burmese workers in this industrial province, Ti and Ario live in a confined space in a grimy apartment, earning a daily wage of 191 baht each.

Ti said she and her husband learned of the deadly storm from television coverage five days ago. First they thought the storm only affected Rangoon and were confident their family, who live in the far south, would be safe.

But they later learned from their foreman and fellow workers that the Nargis catastrophe was far more serious than they thought and it also struck their hometowns in the Irrawaddy division.

Ario, 34, hastily contacted his relatives in Maubin township and was informed that everyone was safe. But

Ti could not reach anyone at Mawkhon, her village.

"They said more than 500 people in my village were killed in the storm," Ti told a volunteer from the Samut Sakhon-based Labour Rights Promotion Network (LPN).

She looks pale and exhausted after a

"I REALLY WANT

TO KNOW IF MY

FAMILY IS

STILL ALIVE."

TI  
A BURMESE MIGRANT WORKER

See THE PAIN OF NOT KNOWING Page 2

Some users not seduced by love potion

Costly 'namman prai' sparks complaints

Thailand has its own black magic love potion called *namman prai* (prai oil), but its magic has never been proven.

Consumers have been warned about the oil after a consumer laid a complaint. The woman, whose name was not released, lodged a complaint with the Foundation for Consumers against a trader who persuaded her to buy the oil over the internet.

She transferred 20,000 baht to his bank account as he requested.

A man, calling himself 'master', told me he could solve my problem. His *namman prai* was ready for use. He asked me to transfer the money to his bank account," she said in her complaint.

She followed his instructions, but she never received the oil.

*Namman prai* is a product obtained... in black magic. Sometimes referred to in horror movies, the oil is believed to boost the seductive allure of users.

Legend has it that if men sprinkle a few drops on women they fancy, they can easily seduce them.

The price can range from 1,500 to 10,000 baht for a small bottle.

According to ancient tales, *namman prai* is obtained by using a candle to singe the chin of dead people, mainly pregnant women who died in accidents.

"Our *namman prai* is now a hit among teenagers. If I cannot make you attractive to the girls within seven days, you can claim a refund," said one advertisement posted among more than 100 websites offering *namman prai*.

Food and Drug Administration secretary-general Chattr Banchuan said the advertisements are bogus. His office was looking at whether traders offer it in the form of medicine, which would break the law and make them liable to penalties.



A small bottle, claimed to contain the local version of Spanish Fly and known as 'namman prai' oil, was posted on the internet by a seller in Lampang who claims it can solve family problems.

www.coca.com

## KOBE TWIST

Kobe beef comes only from a Japanese black Tajima-ushi breed of Wagyu, raised according to strict tradition in Hyogo Prefecture. These practices include an organic diet of sake and beer, and daily massages to tenderize the flesh. Soothing music is also played to the cattle to "calm" them and promote better quality beef. Kobe beef is renowned for its flavor, legendary tenderness and tremendous marbling. Its juicy, buttery, with a melt-in-your-mouth quality that puts even prime ribs to shame.

This quality luxury from Japan can be enjoyed at any Coca branches in Thailand today.

Two complimentary glasses (125ml each) of 2003 Mango Tree, Cotes-de-Bourg A.O.C, Bordeaux with every order.

Thailand | Singapore | Japan | Taiwan | Myanmar | Indonesia | Malaysia | Lao P.D.R. | Korea | Cambodia | Vietnam

Simple, Healthy & Lovely



## Home

# Jakrapob to ban PRD staff taking of coup

Minister tightens the screws on state news

By Anucha Charoenp

PM's Office Minister Jakrapob Penkair said he will ban Public Relations Department (PRD) staff from reporting any news stories supporting a coup.

"Staff of the state media who encourage a coup either directly or indirectly would be regarded as committing a disciplinary offence," he said yesterday.

He said the new regulations regarding the issue would be implemented soon.

The new policy is anticipated to trigger criticism and debate among the public. "Let people debate. I want to know as well who would say the media may support a coup. I want to see who such people are," said Mr Jakrapob.

He said the state media must not play a role in dividing the public.

His order does not apply to newspapers, magazines and community radio. But he called on reporters at private companies to use careful judgement before reporting anything.

"It is the duty of society to watch them (the private media, not of the government)," he said.

He also said media control is his responsibility, and insisted he does not want to have problems with the media beyond his role.

Mr Jakrapob also said he would push the National Broadcasting Service of Thailand, or NBT, channel operated by the PRD, to be a rival of the Thai Public Broadcasting Services (TPBS).

He said TPBS, which was transformed from TV by the previous coup-installed government, is the product of a dic-

torship and was wrongly conceived and implemented.

"But I would not do anything to jeopardise it (TPBS). I will create the NBT to compete with it. I will tell society that NBT, which is a state-run organisation under a democratic government, is able to produce TV programmes useful and relevant to the public's interest," Mr Jakrapob recently said at the Foreign Correspondents Club of Thailand.

Mr Jakrapob, who is accused by the opposition Democrat party of abusing his power by supervising the NBT and has been taken to task for his handling of state media, conceded he had tried to oversee the TPBS but its regulations did not allow him to do so.

He said the budget of about two billion baht from sin taxes to be annually spent on TPBS was much more than the 302 million baht for the NBT.

The NBT Channel, which was changed from Channel 11 on April 1, has undergone changes to live up to the people's expectations, he said.

Senator Somchai Suvangkam, the former chairman of the Broadcast Journalists Association, said for TV audiences the two stations had performed well in their reporting since the changes.

Mr Somchai said they screened diverse programmes focusing on family, entertainment, children, news and tourism.

"I don't want Minister Jakrapob to think about fierce competition with TPBS. Instead, he should give his backing to it and make many more TV channels in the country be public broadcasting services in the future," he said.



## Ready, aim...

Students from the Kaha Yungsohong Wittaya school get ready to shoot micro-organism balls into the Lad Tone canal yesterday as part of the Laksi district office's celebration of its success in reviving the pollution-clogged canal with bio-organisms. PHOTO BY ANANACHITRA

## New screening test to ward off thalassemia

### Thais develop diagnostic method

By Apiradee Treerutkaur

Thai scientists have discovered a method to protect newborns from thalassemia, which is prevalent and causes an enormous financial burden on the country and the region.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is an alternative for couples who carry thalassemia and want to start a pregnancy with an unaffected foetus. Embryos are screened to prevent a child with a genetic disease being born.

Wirawit Pisanomgolk, a doctor at Chiang Mai University's department of obstetrics and gynaecology, said his team

of researchers had studied the subject since 2005 in a bid to develop and apply scientific technology for beta-thalassemia and Down's syndrome protection.

Carrier screening for couples at risk and the termination of an affected pregnancy is the most common solution. PGD would be an alternative, providing couples with the chance to start a pregnancy and eliminating the need for an abortion, he said.

Thalassemia, which is the world's most common gene disorder, is prevalent and causes an enormous financial burden on Thailand and throughout Southeast Asia.

An estimated 40 million Thai people are carriers and 600,000 of them need treatment. About 12,000 newborn babies are also found to be affected by thalassemia each year.

Babies with the severe form of beta-thalassemia need blood transfusions within six months of birth. However, blood transfusions may also lead to infections with HIV, Hepatitis B and C or iron overload.

The only means of curing this condition is through bone marrow transplants. However, the process is risky and expensive as it costs between 400,000 and 1.5 million baht for the treatment.

Dr Wirawit said the most widely applicable strategy for dealing with thalassemia still has to be control the incidence of new cases by offering screening for pre-natal diagnosis with termination of pregnancy in affected cases.

However, the PGD could be an alternative to the screening routine because it allows selection of unaffected embryos prior to the establishment of a pregnancy.

A study was undertaken on couples at risk of having an affected foetus with beta-thalassemia. The parents were both carriers of beta-thalassemia and had experienced one termination of pregnancy following a positive prenatal diagnosis of beta-thalassemia.

The process involved removing a cell from an embryo at the eight-cell stage of development, when it was about three days old, and testing it for genetic disorders so that an unaffected embryo could be implanted into the mother's womb.

Using this technique, a disease-free baby boy was born in June 2005. Such a technique had been used in countries having high thalassemia incidents, such as Greece, but none had been conducted in Southeast Asian countries.

## Border trade back to normal in Chiang Rai

By Post reporters

Border trade is back to normal in Mae Sai district of Chiang Rai following the eight-hour border closure yesterday by the Burmese junta so that Burma could smoothly hold its constitutional referendum.

Vehicles were not allowed to cross the two Thai-Burmese Friendship Bridges until 2pm yesterday.

Over 10,000 Burmese turned up to vote at polling stations scattered in villages in Tachileik province. They queued up in front of soldiers standing

guard to maintain law and order.

Because of threats by the military that action would be taken against those failing to vote, all the residents went out to tick their ballots yesterday.

The anti-junta Moussatche brothers joined the few anti-junta voices during to vote against the constitution.

Par Par Lay, 60, the eldest brother of Burma's well-known *do-mayin* family comedy troupe was delighted to receive rare visitors at a dim-lit house in Mandalay which was decorated with dusty Burmese puppets and T-shirts for sale.

The three-time prisoner, who was released from jail after serving a five-week imprisonment in October, explicitly showed his full support for Aung San Suu Kyi, leader of the National League for Democracy (NLD).

"How come we endorse a regime that is concerned about their own security rather than the people's security? The Burmese people can't see the dentists in their own country, not because we don't have good dentists, but because we can't open our mouths," said the 57-year-old Lu Maw, his younger and funnier brother.

FROM Page 1

## THE PAIN OF NOT KNOWING

week of extreme anxiety and hard work during the night shift at the factory.

Pointing at a picture of cyclone victims, Ti said in a soft voice: "I'm afraid that my parents and my brothers and sisters will be one of them."

The couple said they wanted to go home and struggle along with their relatives but they had no money and no idea how to reach the cyclone-devastated areas at the moment.

All they could do now was pray before a small Buddha image brought from Burma to protect their family members. Aiao said he was glad to see international military planes carrying food supplies and survival kits to help the Burmese people.

But when the LPN volunteer informed him that international aid agencies have been facing difficulties airlifting in disaster relief, he looked very worried.

"This is not good. Our relatives are in dire need of help," said Aiao.

Sam, a Burmese foreman who takes care of hundreds of Burmese workers in Samut Sakon, said at least 30 people who come from the cyclone-hit areas were extremely worried about their families. Only two had managed to contact their relatives so far.

Sam said he tried to help the workers contact their families, but it was very difficult because the telephone lines were down in the affected areas.

He gathers as much information as possible and keeps updating the workers on the situation.

"We also called on workers to donate some money to pay for trips for our fellow workers from the affected towns



## Royal relief

AC-130 military transport plane loads relief aid packages donated by Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn and the Thai Red Cross. Food, power generators, tents and medicine were among the items flown to victims of Cyclone Nargis in Burma. PATTANONG HIRUNWAD

who want to see their families after the disaster," he said.

A trip from Samut Sakon to the Thai-Burmese border in Mae Sot district of Tak province costs about 2,200 baht.

Migrant labour advocacy groups, Burmese worker representatives and Burmese monks studying at Mahachulalongkornrajavidyalaya University, held a meeting in Bangkok on Wednesday after receiving reports that a number of Burmese workers in Thailand had lost contact with their families.

"What has been missing in the disaster relief for the cyclone now is communication. Thousands of Burmese migrants here need to know if their loved ones

are alive. The cyclone-hit villagers also want to contact their relatives here," said Aidsorn Kerdmongkol, a Burmese labour advocate from the Peaceway Foundation.

The situation is similar to what happened in the aftermath of the December 2004 tsunami when families of Burmese migrants did not know the fate of their sons and daughters working in the six Andaman coastal provinces.

The group agreed to set up a committee to assist cyclone disaster victims.

The committee will work on transferring donations to the victims in Burma and help Burmese in Thailand track down relatives in the cyclone-hit areas.

## Bangkok Post Foundation Help us Scholarships for needy children nationwide

The Bangkok Post Foundation was established in 1982. The primary objectives are:

1. To promote education and help the educational activities of needy school children.
2. To promote education and research work for the press.
3. To cooperate with other charities for the public interest.

The criteria for allocating assistance are that the children must be 1) poor and 2) have a strong desire to study.

At this point, it is the foundation's objective to embark on a fund raising campaign. Increased interest earnings in 2002 would enable the foundation to expand assistance to students in other regions of Thailand.

Before deciding to allocate funds to individual students, staff members visit the children's homes and speak to their teachers in order to assess whether they genuinely need assistance.

For more information  
http://www.bangkokpost.com/bnf/

Tel: +66 (2) 240 3700 ext. 3224 (Khun Kusuma Mintakhin, Editorial Department)

## DONATION

Yes! I would like to make a donation... (Baht .....)

Donations can be made in any currency.

### PAYMENT DETAILS:

PLEASE CHARGE THE AMOUNT OF TO THE CREDIT CARD BELOW.

CARD NO. \_\_\_\_\_

CARD TYPE \_\_\_\_\_ EXPIRY DATE \_\_\_\_\_

CARDHOLDER'S \_\_\_\_\_

LAST 3 DIGITS NUMBER ON SIGNATURE \_\_\_\_\_

AUTHORISED SIGNATURE \_\_\_\_\_

(ONLY VISA, MASTERCARD, AND LOCAL BANK CARDS ACCEPTED)

BANK TRANSFER TO "BANGKOK POST FOUNDATION"

SAVINGS ACCOUNT NO. 218 058 741, BANGKOK BANK, SAKHONGRANGSABAN

PLEASE FAX BANK TRANSFER SLIP & THIS FORM TO +66 (0) 2249 3666.

ATTENTION: KHUN KUSUMA MINTAKHIN, EDITORIAL DEPARTMENT

SEND A CHECK/PAYABLE TO "BANGKOK POST FOUNDATION"

ATTENTION: KHUN KUSUMA MINTAKHIN, EDITORIAL DEPARTMENT, BANGKOK POST BUILDING, 154 HANRANGKONG ROAD, KLONG TOEY BANGKOK 10110



## help them.

Chakrit Multakul  
Aged 10, P4  
Ban Nuan Prang School  
Tha Li district, Loei

Chakrit was living in poverty with his grandmother when members of the Bangkok Post first met him two years ago. His mother is in prison on drug-related charges while his father is believed to be addicted to narcotics and has no one knows where he is. Teachers say Chakrit does well in school and has a lot of potential. He came first in his class and has dreams of becoming a doctor. His grade is 3.2.

He gets 2-3 baht a day to take to school and he is not enough and sometimes the school provides him with a free lunch.

Bangkok Post Foundation  
is a charity organisation listed under the Ministry of Finance (No. 496).  
Any donation is personal income tax - deductible under the Revenue Code

## Knowledge Inspiration Spirit

Celebrating its 10th anniversary this year, KIS International School is an established IB World School, authorised to offer the full range of IB Programmes (Primary Years, Middle Years and IB Diploma), for students from 3 to 19 years.

## Academic Scholarships

Open to students of any nationality, aged 13-17 years, who achieve above average score in English and Mathematics and who show promise during interview.

Scholarship valid for the duration of education at KIS Application deadline May 22, 2008

Please contact admissions at 02-2743444 or email to info@kis.ac.th, www.kis.ac.th





SET ๙ เมษายน ๒๕๖๑ ตลาดหุ้น

SET	846.71	3.46	-0.41%
VALUE	20,196.48 ล้านบาท		
31.875	(บาท / US)	ค่าเงิน	
13,158.88	บาท	ทองคำ	
37.09	บาท	น้ำมัน	
33.09	บาท/ลิตร	ทองคำ	

http://www.manager.co.th

# ผู้จัดการ

ขอแค่เขินยามเฝ้าแผ่นดิน

สราวุธ

วันจันทร์ที่ 12 พฤษภาคม 2551 ปีที่ 18 ฉบับที่ 5439 (5437)

ราคา 20 บาท

ขอแค่เป็น **ยามเฝ้าแผ่นดิน**

INSIDE

- **คำบุญ สิทธิสมาน**  
จักรภพ เพ็ญแข ระวัง! จะถูก  
วิสามัญฯ ตัดตอน?...หน้า 12
- **ปราโมทย์ นาคทรรพ**  
จดหมายขอร้องนายกรัฐมนตรี  
สมัคร สุนทรเวช (2)...หน้า 13

➤ **การค้า**  
ศึกษาต้นทุน 373 สินค้า  
กันพอค้ามั่วฉิม เบรกน้ำ  
อัดลม-นมข้นหวาน  
ขึ้นราคา

➤ **Investment**  
กองทุนเลี้ยงชนเงิน  
ลย ตปท.

➤ **ปรีทรรณ**  
DemoCrazy :  
เด็กบ้า(กั)การเมือง

**แพรวพราว**  
**true** ขอเชิญชวน  
ประเทศโครงการงาน  
วิทยาศาสตร์  
ระดับประถมศึกษา-มัธยมศึกษา  
**นักวิทย์น้อยกร** ประจำปี 2551  
เปิดรับสมัคร 2 มี.ค. - 9 ก.ค.2551  
สอบถามโทร.02-615-9743, 02-218-2376  
**true**  
Sugartvaree

หมักขุ่ฟองสือแจ  
ยกเขาพระวิหาร  
แลก“ขดน้ำมัน”

**ผู้จัดการขาย** - “สมัคร” ทำเรื่อง  
ส่งทางไปรษณีย์เพื่อเสนอตัวมาขาย  
ให้กับบริษัทคุณนี่แหละ ที่เห็นคุณ  
ทำอะไรเป็นงานขายโดยเอาภาพมา  
พาดไปปกเล้า ที่เห็นก็เอาภาพมาเล่า  
ให้ฟังโดยไม่ได้อ่านว่า ต้น “บทสอ”  
เสียงจะเข้าเอาแล้วกันทำไมไปบอก  
แก่สอแล้วละนั่น อ้าวถ้ารู้ตัวก็ตัดกับ  
นายมากินจุฬาทะเหิรเรื่องบางเรื่อง  
“วิภา” และเตรียมจะออกแถลงการณ์  
ร่วมกัน

นายสมัคร จูฬสุวระ นายก-  
รัฐมนตรี และ นายภาณุ นกกลั-  
ยกุลนี่เห็นสิทธิประโยชน์แล้วแต่ทำไม  
นายรัฐมนตรีจะพาไปกินข้าวที่ร้าน  
จูฬนันทน์นี่แหละที่พี่สาวเขาเคยไป  
ประกาศว่าจูฬนันทน์โดยเอาภาพมา  
ไปปกเล้าว่า อย่างนี้ไม่ได้ใช้ศาลตัดสิน  
แต่ใช้การประนีประนอมได้ทางนั้นสิ  
คือพี่เขา เห็นว่าไม่ได้ประโยชน์  
● **อ่านตอนที่ 3**

● อ่านต่อหน้า 3  
อ่าน...ชลิตแดง'จักรภพ'  
กับเสนอข่าวปฏิวัติ  
สมัครสมัคร. ฟินคนก๊วติก  
...หน้า 15

# ยี่“ชัย”ชท.งคออกเสียง

## ‘เต็ง’ล้นส่งสอนพปช.

ผู้จัดรายการวัน – “ดีจัง” ด่วนออกหู “พรศักดิ์” ลูกไล่ “เนวิน” ลังประชุม  
 ตัวเล็กประชุมจนกว่าวันนี้ สัน ฑน.ไปโรงเรียนที่ท่าข้ามบนถนน  
 “สมัคร” พระเชลยไปโรงเรียนที่ไม่ประสาสามา ขึ้นไม่จำเพาะที่สามไปหา  
 อัยการสูงสุด ส่วนเล็กที่ประชุมพร.จกออกเสียง ประชุมให้ทราบเกี่ยวกับงาน ด้าน  
 “สมัคร” จึงลง “พอเชย” รับปรึกษาใน พล.ศ.ส.จนลง “เอา” ขึ้น  
 ประชุมสามา หวัง “ไป” ใช้เสียงมากในเวทีให้ตอบว่า ท่าก่อนหน้า “แต่เล็ก”  
 ผนวไปใกล้แตกแค้นแห่งถูกาหัว ที่สุดมีมติชนะ 94 ด้าน 24 ออกออกเสียง  
 แต่กลุ่มเสียงส่วนใหญ่ ยึดถืออยู่ก่อนหน้าที่จะก่อในหัวตวันนี้ ขณะนี้ ประ  
 เสนอเรื่อง “ปัญญาคู” สี่

วันที่ 11 พ.ค. เวลา 18.00 น. มีการประชุม สส.จังหวัดเพื่อพิจารณาหาญ  
ตัดสิน โดยมีการอภิปราย ต่อมากรมการ  
บริหารพลเรือนได้ ส.ส.บางรายต้อง  
ตอบคำถามจากผู้บริหาร ที่เลือกเข้า  
ชิงชัย ประเด็นการพิจารณาประเด็นทาง  
พรรคการเมือง (ปาร์ตี้) เป็นประเด็นยก  
ยอในการดู เปรียบและตอบ เพื่อชี้  
ชัดจากข้อโต้แย้งและมีการเขียนใบเสนอ

● **อ่านต่อหน้า 4**



**วันปรีดี** - น.ธรรมศาสตร์จัดงานวันปรีดีพมของค์ โดยมีข้าราชการจากหน่วยงานต่างๆ วางพานพุ่มสักการะอนุสาวรีย์นายปรีดี พมของค์ ผู้ประศาสน์การ มหาวิทยาลัยวิชาธรรมศาสตร์และการเมือง ที่ลานปรีดี น.ธรรมศาสตร์ วานนี้ (11 พ.ค.)

สินเชื่อบ้าน  
ครองแชมป์  
ลูกค้าแห่งปี

**ผู้จัดการรายวัน** - มหกรรมการเงินครั้งที่ 8 ปีตลาดสวนเกาะแสดเศรษฐกิจผู้จัดงานระบุประชาชนสนใจเข้าร่วมชมงานกว่า 700,000 คน รวมยอดธุรกรรม 80,000 ล้านบาท สินเชื่อบ้านยังคงครองแชมป์ ลูกค้าแห่ขอู้ ที่เหลือเฉลี่ยกันไปเป็น เอ็นพีเอ บัตรเครดิต สินเชื่อบุคคล กองทุนรวม และเงินฝาก

นายสันติ วิริยะสวัสดิ์กุล  
ประธานคณะ Money Expo 2008  
เปิดเผยว่า ตลอด 4 วันของการจัดงาน  
มีประชาชนสนใจเข้าชมงานกว่า  
700,000 คน และมียอดธุรกรรมรวม  
ของงานจะใกล้เคียงกับภาคค้า คือ  
800,000 ล้านบาท โดยประชาชนที่สนใจ  
ในบูธผู้ประกอบการในโครงการจะพบกัน  
ขึ้น ซึ่งถือเป็นการนัดแนะล่วงหน้า  
ตามกลุ่มเป้าหมายที่จะเข้ามามีงาน  
ใน งาน โดยกลุ่มงานนี้จะมีงาน ๑๒ ชิ้น  
ซึ่งมีทั้งด้านมา นายสมเกียรติสาธร  
ดำรงตำแหน่งไม่มีการเปลี่ยนแปลง  
๑๒ ชิ้น และด้านผู้ประกอบการ  
เกือบทุกวงการทั้งสิ้น ๑๒ แห่ง  
จึงถูกต้อง:

นางสาวพรพรรณกาศพาพันธ์  
ระบุว่า งานมหกรรมการเงินนี้

● **อ่านต่อที่ 3**

● อ่านต่อหน้า 3

หวั่นเงินไม่เข้ากองทุนอ้อย  
มติกรม.ขึ้นน้ำตาตมปัญหา

ผู้จัดการรายวัน - “กอน” เตรียมหาวิธีอันใหม่เพื่อประกาศใช้เงินอ้างอิงบนแพลตฟอร์มใหม่ที่มีสภาพคล่องใช้ได้กว้างขวางประกอบประวัติศาสตร์ “นิทานคน” เงินให้รางวัลไดนามิที่รัฐบาลเคยใช้ คาดใหม่เงินเข้าตัวแต่เตรียมรับเงิน 169 ล้านตลอดผ่านปีภาษีที่สร้างไว้เปิดกับ ธ.ก.ส. เผยเป็นนโยบายประชานิยมแบบฉบับรัฐบาลลูกกอก ปูฐานเสียงชาวไร่ด้วยตัวหน้า ๖๐๓ที่ “ศิริวั” ได้ส่งต่อหัวฐานเสียง ข.จนแก่กับ “ศิริวั”

จากการนี้ที่รัฐบาลปรับขึ้นราคาก๊าซหุงต้มเพื่อลดภาระค่าครองชีพให้แก่ประชาชน โดยที่ค่าเฉลี่ยของค่าครองชีพของครัวเรือนไทยได้เพิ่มขึ้นจากการปรับขึ้นราคาพลังงาน

ของชาไร้ชื้อย โดยมีได้มาไปแบ่งปันรายได้  
เข้าระบบหรือแบ่งปันให้แก่วางงาแต่อย่างใด  
และสำหรับเงินที่กองทุนนี้จ่ายจาก ข.ก.ส. เพื่อ  
นำมาเพิ่มราคาซื้อขายในตลาดหลักทรัพย์ 2550/5  
ให้แก่ชาไร้ชื้อยอีกทีละ 169 บาท นั้น  
กองทุนจะจ่ายตรงผ่านบัญชี ข.ก.ส. ของชา  
ไร้ชื้อยที่ส่งชื้อยเข้าที่บิโงรงงานในฤฤฤฤ  
ผลิตดังกล่าว

● อ่านต่อหน้า 2

## ซากศพในพม่ายังเกลื่อน

**ผู้พิการการวัน** - ทานและซากฟอสเฟต "นารีสี" ยังเคลื่อนไม่ลงน้ำและออกยี่สิบ  
ในน้ำแล้วจะพบตัวปลาจำนวนมากอยู่ภายในน้ำ เมื่อถึงงานการวันผู้พิการ  
ยังจำไปให้ไว้ที่ร้าน ที่วันมาจะอยู่ผู้พิการเป็นวัน 28.48 คนที่ 33.416 คน  
ผู้พิการ "สีด" ยังเป็นอยู่เพราะเหตุการวันในมาจะวัน 10 คน ที่นอนอยู่  
รูปทรงปลาที่นอนอยู่ผู้พิการอยู่ด้วย "นารี" นอนอยู่ที่บ้านในวันนั้นด้วย แล้ว  
"สหาย" ยังนั่งเป็นแม่ปลาในน้ำ ที่นอนอยู่ผู้พิการที่นอนอยู่ตามแผน  
ให้ทราบถึงการวันมาจะวันผู้พิการ (11 พ.ค.) ที่นั่งวันผู้พิการ  
เพื่อใช้ลดคนผู้พิการ ขึ้นเป็น 28.48 คนที่ 33.416 คนผู้พิการ  
ผู้พิการที่นอนอยู่ในวันนั้นอยู่ด้วยที่นอนมาจะวันผู้พิการในวันนั้นผู้พิการ  
ผู้พิการที่นอนอยู่ในวันนั้นอยู่ด้วยที่นอนมาจะวันผู้พิการในวันนั้นผู้พิการ  
ผู้พิการที่นอนอยู่ในวันนั้นอยู่ด้วยที่นอนมาจะวันผู้พิการในวันนั้นผู้พิการ

● อ่านต่อหน้า 3

ผู้จัดการออนไลน์



www.manager.co.th/Home

**Regro** สิงห์ 11 ชมพูสำหรับ  
พบบางฤดูร้อน

Regio แดงถูกทำขึ้นแบบมาตรฐาน  
มี 3 สูตร และใช้กันไม่ได้ทั้งคนและกวาง

- สูตรสำหรับคน
- สูตรสำหรับคนและกวาง
- สูตรสำหรับคนและกวาง

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร Kigoro  
 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร Kigoro  
 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร Kigoro

02 681 0123

**เราคือ ONE**

**พิเศษ** ชีวรถ **ฮิโน ซิสส์ 5** ทุกรุ่น มีแต่ได้กับได้ วันที่ 31 พฤษภาคม 2551

**ไฮสเปค** คู่แข่งบริการ **ฟรี 2 ปี** หรือ **100,000 กม.**

**ไฮสเปค** เลือกกับ **ของกันอุตสาหกรรม** เพียง **15,000 บาท**

**ไฮสเปค** มีประกัน **The 62nd IAA** **2008**

**ฮิโน** 55 ปีของความสำเร็จ 5 ปีของนวัตกรรมที่ไม่มีใครเหมือน

ฮิโนประเทศไทย จำกัด (มหาชน) โทร. 02-2900-5000 Hotline: 02-29000-5260 E-mail: info@hinothailand.com http://www.hinothailand.com








**Today** ปีที่ 6 ฉบับที่ 1,922 วันจันทร์ที่ 12 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 [www.posttoday.com](http://www.posttoday.com) ▶ ราคา 15 บาท

**รู้ไหมนักลงทุนต่างชาติ มองเศรษฐกิจ-การเมืองไทยยังใจ  
หวั่นส่วนประเทศไทย  
โดย เศรษฐา ทวีสิน** วิเคราะห์ 2

 เส้นทางวิบากสู่ความสำเร็จของ Cirque du Soleil  
HR Variety  
โดย รศ.ดร.ศิริยุพา รุ่งเรืองสุข C 2

การต่อต้านการขยายอิทธิพล  
 1 กรมสนธิสัญญาฯ เป็น  
 สัญญาผูกมัดระหว่างราชการประจำ  
 ต่อฝ่ายการเมือง โดยมีผล  
 ประโยชน์ของชาติควรพิจารณา  
 พระวิหารเป็นเดิมพัน ○















**◀ จัมนักค้า**  
ดร.ปิ่นสวนข พท.  
เมืองเชียงใหม่ จัมนักค้า  
ชายเอกสิทธิ์ จันดีสิงห์  
อายุ 23 ปี อยู่บ้านเลขที่  
162 หมู่ 9 ต.แม่ป๋วย  
อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ อาชีพ  
เก็บเงินผลผลิตจากสวน  
หลวง หลังจบมัธยมศึกษา  
ได้ไปเรียน ตามหาข่าว

**ติ๊กสูงฉวางเสียงฟ้งต๋ม!** นักวิชาการ มข. เผยพื้นที่ภาคเหนือ ทั้งเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน ลีกลัง **อ่านต่อหน้า 2**

พระราชทานหมอยา  
ช่วยเหยื่อนาร์กีส  
นเรนทรขบิจาอาศัย  
สมเด็จพระบรมโอรสาธิราชฯ  
สยามมกุฎราชกุมาร พระราชทาน  
หน่วยแพทย์เคลื่อนที่ พร้อมเครื่องมือ  
มือแพทย์จำเป็น จดกระทรวง  
สาธารณสุข ☆ด้านศัลยกรรม☆

**▲ ร้องช่วยพม่า.....**ศูนย์สตรีศึกษา มช. ร่วมกับคณะกรรมการประสานองค์กรพัฒนาเอกชนภาคเหนือ ร่วมประชุมพร้อมเปิดตัวแถลงข่าวเรียกร้องการให้ความช่วยเหลือผู้ประสบภัยพิบัติ พายุไต้ฝุ่น ในประเทศพม่า ณ ห้องประชุมชั้น 2 ศูนย์สตรีศึกษา มช. เมื่อวันที่ 15 พ.ค.ที่ผ่านมา

ดร.ขวลาอีกไม่นาน  
มั่นใจล่าตัวคนร้ายได้



**PAYAP U**

▲ **มอดพีโน**.....เจ้าหน้าที บริษ.เขียนฉาย สนธิกำลังเจ้าหน้าที่ศุลกากรเชียงของ จ.เชียงราย คัดจับกุมแก๊งขนรถจักรยานยนต์ ซาฮาร่า 3 ปีโม จักรยาน 2 คัน ไร้คนขับนำเข้ามา 2 คัน ขณะคืนรายหลังพบใบปิด เลขที่ 4 เป็นขบวนการ โดยโจรกรรมรถ และควานวัดป้ายแดงฝ่ายนี้กล่าว เนื่องจากเขาได้ควบคุม

มือบช.ยังป่วย  
โรงสีไม่ซื้อข้าว

มือเบกษตรกรชาวนาเชียงราย  
ยังป่วย หลังโรงสีข้าวไม่ยอมซื้อ  
ข้าวในราคา **✎อ่านต่อหน้า 23**

# จับตากาดหลวง หน่อมค้ายาบ้า

**ชร.ปิดดอยคั่น  
ยึดปิ่น-ระเบิด**  
คร.กองเมือง บุกร้างหนุ่ม  
เก็บเงินแพงออกอากาศหลวงแก่งยา  
ป่าขะด่ง **✎ อ่านต่อหน้า 23**

**สกุปหนา 1**  
**ฌนชุกระวัง!! ชุพิช**  
**พลาอโฌนถัฒ ฉะพถัฒ**




จากสถิติของสำนักงานสถิติ พ.ศ.  
2549 รายงานผู้ถูกฆาตกรรม 8,299 ราย เสีย  
ชีวิต 5 ราย อัตราการถูกฆาตกรรม 13.25 อัตรา  
ตาย 0.01 ต่อประชากร ★อ่านต่อหน้า 23

# PAYAP UNIVERSITY ADMISSIONS FAIR

20-23 พ.ค. 51 ฟรีค่าสมัคร

พร้อมอุปกรณ์การศึกษามูลค่ากว่า 500,000 บาท  
 อาทิ notebook, iPod, Printer ฯลฯ ที่...มหาวิทยาลัยพายัพ เขตแม่คาว

มหาวิทยาลัยพายัพ ขอนอมโกาสถาปนาขึ้นเพื่อศึกษาต่อ....  
**พบคุณจารย์** วาฬพเนนเวลาการศึกษา  
**พบรุ่นพี่** พุดดุษฎีเอกเปลี่ยนประสมการณชีวิต  
 การเรียนในวันอาทิตย์  
**ชมกิจกรรมและการแสดงมากมาย**

ดินแดนแห่งปัญญา มหาวิทยาลัยพายัพ โทร. 053-851478 ต่อ 240, 241 [www.payap.ac.th](http://www.payap.ac.th) 







CHIANG MAI UNIVERSITY

FACULTY OF MEDICINE

**ด้วยกรมอนามัย...ครูแพทย์ดีเด่น**  
**ศาสตราจารย์ เกียรติคุณ นายแพทย์ชำนาญ สถาปนกุล**

**ข่าวสาร**

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**คณะแพทยศาสตร์**

Faculty of Medicine, Chiang Mai University ปีที่ 23 ฉบับที่ 5 เดือนมิถุนายน 2551

[www.med.cmu.ac.th/news](http://www.med.cmu.ac.th/news)

16



## เทคนิค

### การวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัว

รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล

อาจารย์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

#### ประวัติส่วนตัว

พ.ศ. 2531	แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2535	วุฒิปริญญาตรี สาขาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา แพทยสภา
พ.ศ. 2541	MSc in Prenatal Genetics & Fetal Medicine, University College, University of London
พ.ศ. 2544	PhD in OB&GYN (Molecular Genetics), University College, University of London
พ.ศ. 2545	วุฒิปริญญาโท สาขาเวชศาสตร์มารดาและทารกในครรภ์ แพทยสภา

#### ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2531 - 2535	แพทย์ประจำบ้าน ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มช.
พ.ศ. 2535 - 2540	อาจารย์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มช.
พ.ศ. 2540 - 2549	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มช.
พ.ศ. 2540 - 2544	Research fellow, UCL Centre for Preimplantation Genetic Diagnosis, the Galton Laboratory, Department of Obstetrics & Gynaecology, University College, University of London
พ.ศ. 2549 - ปัจจุบัน	รองศาสตราจารย์ ประจำภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มช.

#### งานสอนและงานบริการ

- ผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในสูติ-นรีเวช
- ให้ความรู้และคำปรึกษาเกี่ยวกับการวินิจฉัยก่อนคลอดและโรคทางพันธุกรรม โดยเฉพาะโรคธาลัสซีเมียและกลุ่มอาการดาวน์
- การวินิจฉัยก่อนคลอด โดยเทคนิคการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง
- การเจาะตรวจเนื้อรก การเจาะตรวจน้ำคร่ำ การเจาะตรวจเลือดสายสะดือทารกในครรภ์ การรักษาทารกในครรภ์
- คลินิกสตรีวัยทอง

#### ได้รับการแต่งตั้งเป็น

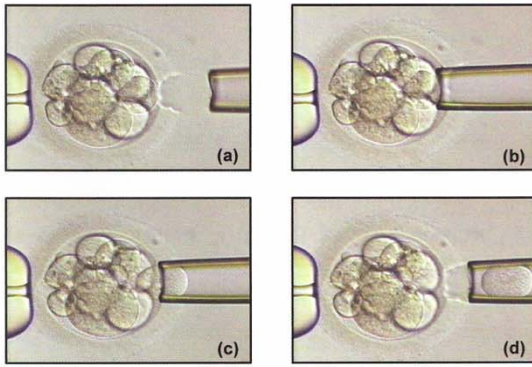
- กรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มช.
- กรรมการดำเนินการศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มช.
- คณะอนุกรรมการประเมินรายงานวิจัย ในการฝึกอบรมและสอบความรู้ความชำนาญ ในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ของราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย ตั้งแต่ พ.ศ. 2547
- กรรมการพิจารณาบทความ วารสาร Prenatal Diagnosis ตั้งแต่ พ.ศ. 2546
- กรรมการพิจารณาบทความ วารสาร Human Reproduction ตั้งแต่ พ.ศ. 2548
- กรรมการพิจารณาบทความ วารสารพิษณุโลกเวชสาร ตั้งแต่ พ.ศ. 2548
- กรรมการพิจารณาบทความ วารสาร Journal of Biochemical and Biophysical Methods ตั้งแต่ พ.ศ. 2550
- กรรมการพิจารณาข้อเสนอโครงการวิจัย พัฒนาและนวัตกรรม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ตั้งแต่ พ.ศ. 2550
- เป็นหัวหน้าโครงการและผู้ร่วมโครงการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติกว่า 40 เรื่อง
- เป็นหัวหน้าโครงการที่ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนพัฒนาคณะแพทยศาสตร์ (ส่วนวิจัย) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สำนักงานทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), สภาวิจัย (วช.)

#### งานวิจัย

- สูติ-นรีเวช
- การวินิจฉัยก่อนคลอด
- เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ
- การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว

ผลงานเด่น โครงการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมีย





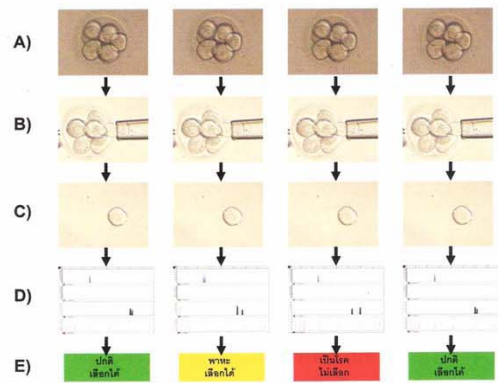
เทคนิคการดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (a) จับตัวอ่อนไว้ให้นิ่งโดย holding pipette ด้านซ้าย เลาะเปลือก zona pellucida ด้วยเลเซอร์ (b), (c) และ (d) เซลล์เดี่ยวถูกดูดออกมาด้วยความระมัดระวังโดย biopsy pipette ผ่านทางช่องของเปลือก zona pellucida ที่เปิดเอาไว้ หัตถการนี้จัดทำโดย **รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช**



#### โรคธาลัสซีเมีย

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดยืนเดียวที่พบได้มากที่สุดในโลก มีความชุกสูงในประชากรแถบเอเชีย และเป็นปัญหาใหญ่ทางสาธารณสุขปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ทารกที่ได้รับการถ่ายทอดยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจะมีอาการซีดอย่างมากและเสียชีวิตในครรภ์ มารดาที่ตั้งครรภ์ทารกดังกล่าวมีความเสี่ยงสูงที่จะประสบภาวะแทรกซ้อนทางสูติศาสตร์ร้ายแรงถึงชีวิต ได้แก่ ครรภ์เป็นพิษ ภาวะคลอดยาก และภาวะตกเลือดก่อนคลอดและหลังคลอด ผู้ป่วยที่ได้รับการถ่ายทอดโรคบีต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจากบิดาและมารดาจะมีอาการซีดมาก จำเป็นต้องได้รับเลือดอย่างต่อเนื่อง มีภูมิคุ้มกันต่ำและประสบภาวะแทรกซ้อนร้ายแรงจากการให้เลือด ได้แก่ โรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบและเอดส์ ภาวะขาดเหล็กคั่งในร่างกาย โรคเบาหวาน วิธีรักษาโรคบีต้าธาลัสซีเมียให้หายขาดโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูกยังเป็นวิธีที่ยังยาก มีความเสี่ยงสูง และมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก กลวิธีในการแก้ไขปัญหาระบาดธาลัสซีเมียที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบันคือ การควบคุมจำนวนผู้ป่วยใหม่โดยการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงที่จะตั้งครรภ์บุตรที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ให้ความรู้และทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

17



การวินิจฉัยก่อนคลอด (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) สำหรับโรคบีต้าธาลัสซีเมีย A) ตัวอ่อนจากการทำทารกหลอดแก้วระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ, B) การดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนโดยเครื่องมือ micromanipulator, C) เซลล์เดี่ยวที่ได้จากตัวอ่อนแต่ละตัวเพื่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ, D) ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ชนิดเรืองแสง, E) เลือกตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคเพื่อใส่ในโพรงมดลูกของมารดาในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ การทำทารกหลอดแก้วและการดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนทำโดย **รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช** การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย **รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล**

โดยการเจาะตรวจเนื้อรกหรือการเจาะตรวจเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ และทำแท้งทารกที่เป็นโรคชนิดรุนแรงหากคู่สมรสต้องการครอบครัวที่มีสุขภาพแข็งแรง ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยบีต้าธาลัสซีเมียจนถึงอายุ 30 ปีมีมูลค่าสูงถึง 6 ล้านบาทต่อคน จากจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่เกิดขึ้นปีละประมาณ 4,000 คน คิดเป็นภาระค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น 24,000 ล้านบาททุกปี จากภาระผู้ป่วยเดิมที่มีอยู่แล้ว 523,750 คน

#### การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว

การวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการเลือกตัวอ่อน (embryo selection) หรือ designer baby เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มารดาที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มต้นการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปลอดจากโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis, PND) พบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งบุตรหรือภาวะทารกพิการอันเนื่องมาจากหัตถการในการวินิจฉัยก่อนคลอด การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจึงเป็นวิธีลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่มีชีวิตต่อจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย





เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวจำเป็นต้องใช้เทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เทคนิคการเก็บตัวอย่างจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือการดูเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy) กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว แล้วดูเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก ข้อดีของเทคนิคนี้คือ การตัดตรวจ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไม่มีผลเสียต่อพัฒนาการของตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ จำนวนเซลล์ที่ได้เพียง 1-2 เซลล์เพื่อใช้ในการวินิจฉัย และระยะเวลาในการวินิจฉัยที่มีเพียง 24 ชั่วโมง เนื่องจากศูนย์การทำทารกหลอดแก้วส่วนใหญ่ต้องการที่จะใส่ตัวอ่อนเข้าไปในโพรงมดลูกในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ ทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคดังกล่าวให้มีความรวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง

มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่างๆ โดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ทางอณูชีววิทยา สำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยว เช่น ธาลัสซีเมีย ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นโครงการที่มีความละเอียดอ่อนและซับซ้อนสูง จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือของผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหลายสาขาวิชา ได้แก่ นรีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลการทำทารกหลอดแก้ว นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลตัวอ่อนมนุษย์ นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว และสูติแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลมารดาและทารกในครรภ์

การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามตำแหน่งของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน (mutation) ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ ปัญหาสำคัญในการตรวจวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดียวได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplification failure, AF) ปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ (allele drop out, ADO) และปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาไม่ได้ผลการวินิจฉัยหรือการวินิจฉัยผิดพลาดได้

สถานการณ์ในประเทศไทย โดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ กองทุนพัฒนา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) สภาวิจัย (วช.) และ บริษัท ออร์แกนอน ประเทศไทย จำกัด รศ.ดร.นพ.วีรวิทย์ ปิยะมงคล และ รศ.นพ.ธีระพร วุฒยวณิช และคณะผู้ทำงานได้เริ่มให้บริการการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียระยะก่อนการฝังตัวโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียก่อนการฝังตัวเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทารกจากการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวรายแรกนี้เป็นเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียีนผิดปกติของธาลัสซีเมีย ผลความสำเร็จดังกล่าวได้รับการนำเสนอในการประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 11 ประจำปี 2548 เมื่อวันที่ 1-2 กันยายน 2548 ได้รับรางวัลชมเชยประเภทการวิจัยทางคลินิกจากการแสดงผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการวันมหิดล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ครั้งที่ 29 เมื่อวันที่ 23 กันยายน 2548 นำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปี “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” เมื่อวันที่ 13-15 ตุลาคม 2548 ในการประชุมวิชาการประจำปี ราชวิทยาลัยสูติ-นรีแพทย์แห่งประเทศไทย เมื่อวันที่ 19-21 ตุลาคม 2548 และได้รับการคัดเลือกให้นำเสนอผลงานในวันวิชาการมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 8-10 ธันวาคม 2548

**โดยสรุป** การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวหรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครครห์โดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมียีนผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่า สามารถทำการตรวจได้ทั้งความผิดปกติทางโครโมโซมและความผิดปกติทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยว การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในการตรวจโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่มีความจำเพาะในแต่ละความผิดปกติ ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการพัฒนาอย่างมาก สถานการณ์ในประเทศไทย การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคธาลัสซีเมียและอัลฟาธาลัสซีเมียประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่







## บริจาค



**คุณธน ภัทโยธิน** มอบเครื่องช่วยหายใจแบบเคลื่อนที่ จำนวน 1 เครื่อง มูลค่า 500,000.- บาท ให้แก่ หน่วยตรวจฉุกเฉิน โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมี **รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต** คณบดีคณะแพทยศาสตร์ มช. รับมอบ ณ บ้านพัก เมื่อวันที่ 5 มิถุนายน 2551



**คุณกรรณิการ์ ลินพิศาล** มอบเงินจำนวน 400,000 บาท เพื่อสมทบทุนมูลนิธิโรงพยาบาลสวนดอก โดยมี **รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต** คณบดีคณะแพทยศาสตร์ รับมอบ เมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2551 ณ ห้องรับรอง สำนักงานคณบดี



**รศ.นพ.ดำรง - คุณจันทรา กาวีไล** ผู้แทน ศ.ดร.สุธี - ศ.ดร.คุณหญิงพยอม สิงห์แสน บริจาคเครื่องมือผ่าตัดผ่านกล้องส่องตรวจภายใน และเครื่องมือจลศัลยกรรม จำนวน 4 รายการ รวมมูลค่า 100,000.- บาท ให้แก่ หน่วยประสาทศัลยศาสตร์ ภาควิชา ศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มช. โดยมี **รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต** คณบดีคณะแพทยศาสตร์ รับมอบ เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2551



**พระครูอุปถัมภ์ศาสนคุณ** เจ้าอาวาสวัดป่าแพ่ง มอบถังน้ำร้อนไฟฟ้า กระติกน้ำร้อนไฟฟ้า เครื่องวัดอุณหภูมิระบบดิจิทัล เทอร์โม มูลค่า 14,500 บาท เพื่อสมทบทุนมูลนิธิอานันทราชมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมี **อ.นพ.นิสิต วรรณนิจธิยา** รองผู้อำนวยการ รพ.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รับมอบ เมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2551 ณ ห้องพิธีการสงฆ์ อาคารสงฆ์อานันท

## เกร็ดความรู้

### 12 วิธีการประหยัดน้ำมันแบบง่าย ๆ

ตอนนี้ราคาน้ำมันก็มีแนวโน้มว่าจะขึ้นต่อไปเรื่อยๆ และเราก็ยังคงเดินทางไปไหนมาไหนโดยอาศัย "รถยนต์" เป็นหลัก ดังนั้นไม่ว่าทางไหนที่จะสามารถประหยัดได้ก็น่าที่จะลองดู เรามีวิธีประหยัดน้ำมันแบบง่าย ๆ 12 วิธี มาฝากกัน ลองปฏิบัติตามดูอาจจะช่วยประหยัดได้บ้างไม่มากก็น้อย

- เติมน้ำมันหลังก่อน 9 โมงเช้าเสมอ**  
อุณหภูมิที่เย็นน้ำมันจะหดตัวได้ประมาณมากขึ้น 2%
- เติมน้ำมันแค่พอจ่ายตัดพอดแล้ว**  
ถ้าเติมน้ำมันเต็มถัง ร้อนๆ น้ำมันจะขยายตัวระเหยทิ้งที่หัวรถบาย
- อุ่นเครื่อง 1 นาทีในหน้าร้อนและ 3 นาทีในหน้าหนาว**  
เครื่องจะไม่ได้ใช้กำลังดูดหมอกและการหล่อลื่นจะสมบูรณ์ขึ้น
- ค่อยๆ ออกตัวเมื่อรถจอดนิ่ง 1-2 วินาที**  
ได้ความนิ่มนวล ประหยัด และลดการสึกหรอของเครื่องยนต์
- ควรใช้เกียร์สูงเมื่อรถวิ่งได้ 2500 รอบขึ้นไป**  
การเปลี่ยนเกียร์ทำให้ตัวเกียร์ทำงานจนอายุการใช้งานสั้น
- เครื่อง 2.0 ลิตรขึ้นไปความเร็วคงที่ที่ 110 กม./ชม.**  
รักษาสถียรภาพความเร็วทำให้กินน้ำมันน้อยที่สุดขณะเร่ง
- เครื่อง 1.6 ลิตรขึ้นไปความเร็วคงที่ที่ 90 กม./ชม.**  
รักษาสถียรภาพความเร็วทำให้กินน้ำมันน้อยที่สุดขณะเร่ง
- พักรถสัก 15 นาทีเมื่อขับเกิน 4 ชม. เพื่อให้อุณหภูมิเครื่องยนต์เย็นลง**  
ให้น้ำมันในระบบระบายความร้อนกลับมามีคุณสมบัติที่ดีอีกครั้ง
- เกียร์ถอยกินน้ำมันมากที่สุด ควรค่อยๆ ถอยไม่ต้องรีบ**  
เกียร์ถอยใช้อัตราทดและแรงดูดมากกว่าเกียร์
- ก่อนถึงปลายทางสัก 500 เมตร ให้ปิด COM และลดความเร็ว**  
ปล่อยให้เครื่องยนต์ใน怠速และปล่อยให้เครื่องยนต์เย็นลง
- เช็คลมยางให้สม่ำเสมอทุก 2 อาทิตย์และเมื่อจะออกเดินทางไปยังจังหวัด**  
ลมยางอ่อนแอได้ช้า ขอบยางสึกมากอายุการใช้งานสั้น
- พยายามอย่าใส่ของไว้ในรถเยอะ**  
เติมน้ำมันให้รถทำให้อัตราการใช้น้ำมันเพิ่มขึ้น 20 % ตามระยะทาง



### แพทย์ มช. ค้นพบทางเลือกใหม่สำหรับคูสมรส (ต่อจากหน้า 1)

(สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), สภาวิจัย (วช.) และบริษัท ออร์แกนอน ประเทศไทย จำกัด รศ.ดร.นพ.วิรัช ภิเษมมงคล และรศ.นพ.ธีระพร วุฒิวนิช และคณะได้เริ่มให้บริการการวินิจฉัยโรคซีสต์เมื่อยะเยาะก่อนการฝังตัวโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว ณ ภาควิชาศัลยศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย และประสบความสำเร็จในการวินิจฉัยโรคปัสสาวะอักเสบก่อนการฝังตัวเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทราบจากการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวว่าทารกนั้นเป็นเพศชาย ตลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 สุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง ซึ่งผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มีเยื่อปิดกั้นของปัสสาวะอักเสบ ผลความสำเร็จดังกล่าว ได้รับการนำเสนอในการประชุมวิชาการซีสต์เมื่อยะเยาะครั้งที่ 11 ประจำปี 2548 เมื่อวันที่ 1-2 กันยายน 2548 ได้รับรางวัลชมเชยประเภทการวิจัยทางคลินิกจากการแสดงผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการวันมหิดล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ครั้งที่ 29 เมื่อวันที่ 23 กันยายน 2548, นำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปี "นวัตวิทย์ใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว." เมื่อวันที่ 13-15 ตุลาคม 2548, นำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปีราชวิทยาลัยสูติ-นรีแพทย์แห่งประเทศไทย เมื่อวันที่ 19-21 ตุลาคม 2548 และได้รับการคัดเลือกให้นำเสนอผลงานในวันวิชาการมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 8-10 ธันวาคม 2548

นับว่าการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคปัสสาวะอักเสบและเซลล์ซีสต์เมื่อยะเยาะได้ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก ณ ภาควิชาศัลยศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

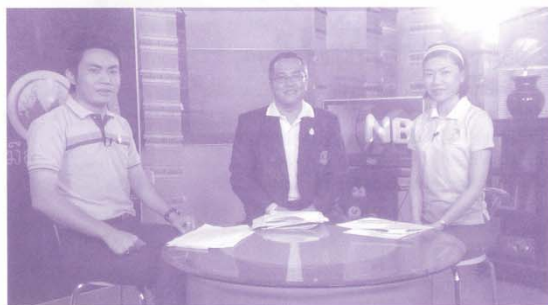


## ร่วมเป็นเจ้าภาพในพิธีสวดอภิธรรม



คณะแพทยศาสตร์ มข. นำโดย **รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต** คณบดี พร้อมด้วยคณะผู้บริหาร ร่วมเป็นเจ้าภาพในพิธีสวดอภิธรรมศพ นายแพทย์ชานน หัสศิริ อดีตผู้อำนวยการ รพ.สวนปรุง ณ ศาลา ๑ วัดพระสิงห์วรมหาวิหาร เมื่อวันที่ ๖ พฤษภาคม ๒๕๕๑

## มองเมืองเหนือ



**อ.นพ. วุฒิเดช โอภาสเจริญสุข** ผู้อำนวยการศูนย์ความร่วมมือ เพื่อการพัฒนา และรับรองคุณภาพโรงพยาบาล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และผู้ช่วยคณบดีคณะแพทยศาสตร์ เป็นวิทยากรในรายการ "มองเมืองเหนือ" ประชาสัมพันธ์การจัดการประชุมวิชาการระดับภูมิภาค The 9<sup>th</sup> Regional Forum on Quality Improvement and Hospital Accreditation "องค์กรที่มีชีวิต" Living Organization ทางสถานีวิทยุโทรทัศน์แห่งประเทศไทย NBT เมื่อวันที่ 5 มิถุนายน 2551

## คุยกับหมอสวนดอก



คณะแพทยศาสตร์ มข. ร่วมกับ สถานีวิทยุโทรทัศน์แห่งประเทศไทย NBT ถ่ายทอดสดรายการโทรทัศน์ "คุยกับหมอสวนดอก" ตอน "การเลือกตัวอ่อน สำหรับโรคซัสเซอเมีย" วิทยากรโดย **รศ.ดร.นพ.วิวิทย์ ปิยะมงคล** และ **รศ.นพ.ธีระพร วุฒิยานันท์** จากภาควิชาสูติศาสตร์ และนรีเวชวิทยา ดำเนินรายการโดย คุณกฤษฎิ์ ช่างเลาห์ศักดิ์พงษ์ หัวหน้าหน่วยประชาสัมพันธ์ งานประชาสัมพันธ์ โดยมี **พญ.อรุณี จันทกานันท์** และ **พญ.ศุภินี วิลาศศึกษาดานนท์** ร่วมรับโทรศัพท์ให้ความรู้ประเด็นดังกล่าวแก่ผู้รับชมจากทั่วภาคเหนือ เมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2551 ทางสถานีวิทยุโทรทัศน์แห่งประเทศไทย NBT

## มูลนิธิโรงพยาบาลสวนดอก



มูลนิธิโรงพยาบาลสวนดอก คณะแพทยศาสตร์ มข. ร่วมกับสโมสรโรตารีเชียงใหม่ จัดกิจกรรมโครงการมอบรถจักรยานจำนวน 100 คัน และเครื่องกรองน้ำ จำนวน 2 เครื่องให้แก่ โรงเรียนบ้านบ่อแก้ว และโรงเรียนแม่ยางห้า อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ โดยมี **รศ.นพ.พงษ์รักษ์ ศรีบัณฑิตมงคล** กรรมการและเลขาธิการมูลนิธิโรงพยาบาลสวนดอก พร้อมสมาชิกเข้าร่วมกิจกรรมในครั้งนี้ เมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม 2551

## ร่วมอนุรักษ์ประเพณี "บูชาเสาอินทขิล"



นักศึกษาแพทย์ชั้นปีที่ 5 แพทย์ใช้ทุน แพทย์ประจำบ้าน ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มข. ร่วมงานประเพณีบูชาเสาอินทขิล ประจำปี 2551 ณ วัดเจดีย์หลวงวรวิหาร อ.เมือง จ.เชียงใหม่ เมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม 2551

## ภาคผนวก 4

การนำเสนอข่าวความสำเร็จของโครงการฯ

โดยสื่อมวลชนในรูปแบบสิ่งพิมพ์

จากการแถลงข่าวโดย

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

14 มกราคม 2552



**AsiaRooms.com**  
Number 1 in Asia

+78,000 Hotels  
Instant Availability  
Secure online booking  
Call Center 24h/7  
Book Now!

# Bangkok Post

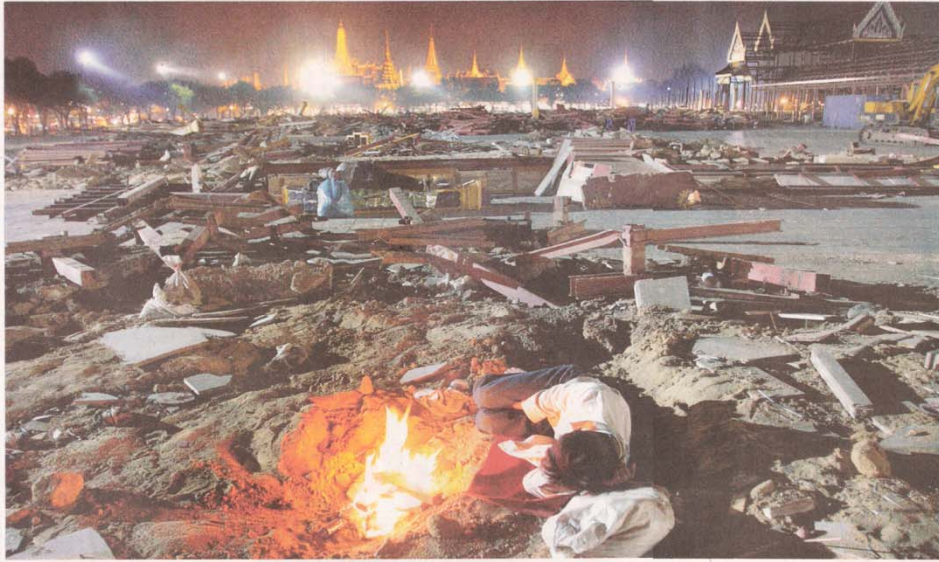
Read more news at [bangkokpost.com](http://bangkokpost.com)

THE NEWSPAPER YOU CAN TRUST

THURSDAY, JANUARY 15, 2009 + 30 BAH

THANKS FARES  
Only through  
[www.bangkokair.com](http://www.bangkokair.com)

**SAMUI** All Inclusive\*  
**2,750\*** One-way  
until 31 March 2009  
\*Special conditions apply



## Burning desire for sleep

A homeless person sleeps beside a fire fuelled by scraps of wood scavenged from the dismantled structures built for the royal funeral of Her Royal Highness Princess Galyani Vadhana at Sanam Luang in November last year. Bangkok and most parts of the country have been gripped by a cold spell in recent days. [PAWAT LAOPAIARATKORN](#) **Story on Page 4**

## CRIME

### Police help close net on US fraud suspect

WASSAYOS NGAMKHAM

A Malaysian man wanted in connection with credit card fraud in the US has been arrested in Nonthaburi, police say. Crime Suppression Division police and US Secret Service agents who deal with financial crimes apprehended Gooi Kok Seng, aka Del Piero, 43, on Tuesday night in front of the Pinnokan housing estate in Pak Kret district.

CSD deputy chief Supisal Pakdinarnuan said Mr Gooi was the subject of an arrest warrant issued by a US court in connection with data theft causing damage of more than \$150 million. He faces charges in the US of illegal possession of a data access device, illegal dealing in a data access device and hacking into a computer.

A search of a house at the housing estate recovered several items including computers.

Pol Col Supisal said the suspect was believed to be a key member of a credit card fraud gang operating in the US. The gang allegedly has stolen credit card data from computers at restaurants and major retailers such as TK and Office Depot. The US Secret Service contacted Thai authorities to seek their assistance after it received information Mr Gooi had fled to Thailand.

Pol Col Supisal said Mr Gooi, who has denied all charges, is facing extradition to the US.

# Stimulus plan under fire

## Top economists say it'll do little to spur the economy

POST REPORTERS

Top economists have given the thumbs down to the government's 115-billion-baht supplementary spending budget, saying it is designed to woo votes rather than prop up the sagging economy.

Of 18 projects to be implemented in mid-March, a scheme to grant a one-off 2,000-baht allowance to eight million employees under the Social Security Fund and 1.4 million civil servants making less than 15,000 baht per month came under the most fire yesterday.

Former finance minister MR Pradyathorn Devakula said the 2,000-baht grant scheme had caught him off guard. "I cannot imagine how the government came up with such a plan. I do not want to say that I cannot believe this is from an Oxford or Cambridge graduate," he said of some cabinet members with backgrounds at prestigious British universities, including Finance Minister Korn Chatikavanij and Prime Minister Abhisit Vejjajiva.

"I am baffled. The 18 billion [earmarked for this scheme] will just disappear. It will not stimulate the economy because it is a one-time payment," he said. "I think paying people 2,000 baht per head is to lure votes," he said.

He said of the total budget, only seven billion baht would be spent creating jobs. MR Pradyathorn also criticised the six-billion-baht skills training scheme aimed at creating new entrepreneurs, saying that at a time when the economy had slowed and purchasing power was limited, it was a bad idea to encourage small-scale operators to invest as there was a high risk of their businesses going under.

"It is like leading them to bankruptcy. I could not believe the government would be so silly. It is utterly silly," he said. The most effective channel to spur the economy was to inject the money through tambon administrative organisations (TAOs).

But he complimented the Finance Ministry's decision not to cut corporate taxes from 30% to 25%, saying it was unlikely the businesses would use the money to invest. Saunee Thairungroj, vice-rector of the Thai Chamber of Commerce University, said the 2,000-baht grant project would target the wrong groups.

She said the unemployed and those below the poverty line would not benefit. Sakon Varanyuwatana, vice dean of the economics faculty at Thammasat University, said the economic stimulus package was a disappointment as it should have focused more on measures which would strengthen the economy over the longer term.

Direk Patmasawat, another Thammasat economist, said he disagreed with free water and electricity and cuts in petrol taxes, as the measures would give consumers the

"wrong incentives". He also doubted whether the schemes would benefit the people in real need.

Lae Dilokvidhayarat, a Chulalongkorn University economist, said the government should have paid more attention to employees or sub-contract workers made redundant as they were directly affected by the economic slowdown.

Worawit Charoenlert, of Chiang Mai University, said the grant scheme was a charity fund and it could be used up in a few days. "It will not stimulate the economy, but it will affect the tax system. The government will have to raise taxes to make up for the lost money," he said.

Prime Minister Abhisit defended the scheme, saying it was not a one-time payment as some were saying.

He said the scheme was in response to the Thailand Development Research Institute's suggestion that the government help employees contribute to the Social Security Fund and the 2,000-baht grant could be used to contribute to the fund. The grant would also reach people faster.

"The measures we are about to implement can be evaluated. We will see if domestic spending will increase or not," he said. He also denied reports that 60% of the economic stimulus package funds were diverted to Democrat-controlled ministries and had disappointed coalition partners.

Editorial: Page 10



I cannot imagine how the government came up with such a plan. I do not want to say that I cannot believe this is from an Oxford or Cambridge graduate.

PRADYATHORN DEVAKULA  
FORMER FINANCE MINISTER

## POLITICS

### Abhisit says country is 'getting back to business'

ANUCHA CHAROENPO  
PRADIT RUANGDIT

The government is striving for political stability and the restoration of international confidence in Thailand, says Prime Minister Abhisit Vejjajiva.

"I want to send the message that we are back in business," the prime minister told a forum yesterday organised by the Foreign Correspondents Club of Thailand.

Mr Abhisit said the main goal of the Democrat-led government was to return the country, plagued by political divisions, to normal by ensuring justice and the rule of law.

The government would carry out its duty with transparency and good governance, he said, adding that the cabinet would work "without corruption and without violations of human rights".

Mr Abhisit interpreted the win of the Democrat party in the by-elections last Sunday, when the coalition parties won 20 of the 29 seats, as a signal from voters that they were behind the government in its efforts to end political instability.

The party also won the Bangkok governor election on the same day with MR Sukhumbhand Paribatra winning the poll ahead of the candidate from the rival Puea Thai.

Mr Abhisit assured fairness for both his supporters and opponents in an attempt to bring about reconciliation.

"We will work for Thais, no matter who they are, no matter the colour of the shirts they wear," he said.

The forum was held at the InterContinental Hotel where about 50 protesters rallied outside with banners calling for the government to stand down.

Thailand needs political reform, Mr Abhisit told those present.

The reform would be carried out by a panel to be set up with representatives from all sectors of the country, he said.

The prime minister conveyed the same message earlier in the day when he met ambassadors and leaders of international organisations based in Thailand at Government House.

He told them Thailand had suffered uncertainty this past year and now was heading towards stability.

He said the government wanted to work closely with foreign diplomats to restore investor confidence.

He urged all countries not to use trade measures to protect their markets.

Protectionism would hamper attempts to tackle the economic situation, Mr Abhisit said.

All ambassadors of the Association of Southeast Asian Nations assured the prime minister their leaders would attend the delayed Asean summit.

The summit will be held from Feb 27 to March 1 in the resort district of Hua Hin in Prachuap Khiri Khan.

The summit will focus on attempts to foster economic, political and social ties among the 10 members of the grouping. Thailand is chairman of the regional bloc until December this year.

Asean comprises Brunei, Burma, Cambodia, Indonesia, Laos, Malaysia, the Philippines, Singapore, Thailand and Vietnam.

Thailand has backed East Timor to become a new member.

[www.htc.com/th](http://www.htc.com/th)

# htc Day

Generation of High Technology Community

15-18  
January 2009

at Promotion Hall 3rd Floor IT Mall

Join the can't miss activities, especially for htc lovers

- htc promotion only available at this event
- Meet celebrities and new artists from Thailand's favorite artists "Tattoo Color" and B.O.Y
- htc Clinic: Full htc check-up and service
- htc Training: Basic to advance training for htc fans

For more information please visit [www.htc.com/th](http://www.htc.com/th) HTC Call Center 02-840-3399

Be part of htc the champion search

Qualify Round  
15 - 17 January 2009  
Final Round  
18 January 2009



TOUCH HD



## CASH FOR CONTRACT

## Japanese arrested over bribe

**TOKYO:** Former senior executives of a Japanese construction firm were arrested yesterday for bringing cash into the country allegedly to pay bribes to other Asian countries, prosecutors said.

Nishimatsu Construction Co and a Thai firm were earlier reported to have given a total of 400 million yen (125 million baht) in bribes to Bangkok Metropolitan Administration (BMA) officials to secure a contract to build a drainage system.

The 2.9-billion-baht project to lay a tunnel stretching from Lat Phrao to the Saen Saep canal in 2003 was undertaken through its consortium with Italian-Thai Development Plc, when Samak Sinda-ravej was the Bangkok governor. It was completed in 2007.

The *Japan Times* and *Japan Today* broke the story in July last year.

Chief of the Drainage and Sewerage Department under the BMA Charnchai Witthoonpanyakul at the time denied any bribery and said City Hall had negotiated with the consortium to lower the price.

Mr Samak has never commented on the issue.

Prosecutors said they arrested Keiji Fujimaki, 68, and three other former Nishimatsu officials on allegations they secretly brought 70 million yen into Japan from Hong Kong and other countries.

"The suspects are believed to have brought it in Japanese banknotes" between February 2006 and August 2007 without filing mandatory reports to the finance ministry, prosecutors said in a statement.

Media reports said the money was gathered illicitly for the purpose of bribes to land contracts in Japan and overseas.

Fujimaki, a former vice president of Nishimatsu, is accused of issuing fictitious orders to firms in Southeast Asia to raise funds for bribes, the *Yomiuri Shimbun* newspaper said.

The company amassed some one billion yen in backdoor money which was mostly kept in foreign bank accounts, it said. **BANGKOK POST AND AFP**

## WILDLIFE

## Theft of swiftlet nests soars

ASSAWIN PAKKAWAN

**PHATTHALUNG:** Thefts of swiftlet nests have risen since border patrol police stopped protecting the nesting grounds in Pak Phayun district.

A source with the 434th provincial border patrol company said border police sent to guard the nesting grounds on Koh See and Koh Ha islands may have colluded with thieves to steal the nests.

Others said they face too many regulatory restrictions in doing their job and the first source said the unit had now decided to stop protecting the nesting grounds. It will be replaced by security volunteers.

The thefts have resulted in losses estimated at 100 million baht a year.

Although local police, administration officers, border patrol police, forest rangers and security volunteers were mobilised to prevent bird's nest thefts, they were mostly unsuccessful.

"To date, 190 thefts of swiftlet bird's nests have taken place," the source said.

"Some government officials are probably complicit. The patrol unit lacks the independence it needs to do its work."

The source said thieves had an edge over the security personnel because they knew their way around the area and operate in a large network.

A complete revamp of the security system around the nesting grounds would ease the problem, he said.

## Expatriate Medical Insurance

Now starting your Healthcare Plan is almost as easy as putting it off

- Hospital Costs up to Baht 80M
- No Hidden Sub-limits
- Worldwide Protection
- Entry Age up to 74 years
- No Claims Discount
- Individual, Family & Group Plans

Monthly & Quarterly Payments Now Available !!!

For more details, Contact Jay Cammack on 02-207-1023 or email: jay.cammack@lap.com.th

N-1

www.n1healthcare.com



## Good works recognised

His Majesty the King is presented with the Wipo Global Leader Award by Francis Gurry, chief of the UN's World Intellectual Property Organisation, at the Kiai Kangwon Palace in Hua Hin district of Prachuap Khiri Khan yesterday. The award honours His Majesty's creativity and innovations, which have been recognised worldwide for their benefits to society. **Photo courtesy of the ROYAL HOUSEHOLD, BUREAU 1 Inventor and developer: Page 11**

## NACC seeks criminal charges over revenue appointments

## Dhipavadee and five others in firing line

Khunying Dhipavadee Mekasawan, former secretary-general of the Civil Service Commission, is facing the threat of criminal action after the National Anti-Corruption Commission backed a court decision critical of the way she made four appointments.

The NACC has decided to ask the Attorney-General to file criminal suits against Khunying Dhipavadee and other former senior civil servants at the Finance Ministry for their "unfair" selection of four deputy revenue chiefs.

NACC spokesman Kianarong Chantik said the Supreme Administrative Court considered as illegal the promotion of Chornrat Petchpaisit, Boonsak Jemprecha, Chundhira Sitsaenghakorn and Wichai Jungtrakul as deputy directors-general of the Revenue Department in 2001.

The court found the appointments did not follow proper criteria and selection processes for executives in the government sector as stipulated by a cabinet resolution.

It believes the appointments might have been decided even before the selection process, which was unfair to other candidates.

The court considered as responsible

for the unfair selection Khunying Dhipavadee, as then secretary-general of the Civil Service Commission, former finance permanent secretary Somchai-ngkul Engtrakul, former deputy finance permanent secretary Somchai-ngkul, Mr Somchai-ngkul and Mr Veera had been involved in their duty under Article 157 of the Criminal Code.

Mr Suparat, the former director-general of the Revenue Department, also committed a "serious disciplinary violation".

Mr Methree left the civil service before the selection of the deputy revenue chiefs.

He was found to have aided the wrongdoing of government officials under Article 157 of the Criminal Code.

which caused severe damage to the cabinet and the human resource management of the state under Article 85 of the Civil Service Regulation Act.

The NACC found Mr Somchai-ngkul, Mr Somchai-ngkul and Mr Veera had been involved in their duty under Article 157 of the Criminal Code.

Mr Methree left the civil service before the selection of the deputy revenue chiefs.

He was found to have aided the wrongdoing of government officials under Article 157 of the Criminal Code.

## LABOUR LAW

## Lay-off loopholes under fire

PENCHAN CHARENSUTHIPAN

Labour activists are calling for the setting up of a tripartite panel to prevent companies from exploiting legal loopholes to lay off workers.

Wist Ruengrit, vice chairman of the Federation of Thailand Automotive Workers Unions, said some employers were invoking a labour law provision that enables them to suspend staff for an unspecified period on minimal pay.

He said a panel representing employers, employees and the government was needed to look into the problem and find ways to prevent the exploitation of workers.

The more than 40,000 workers in the auto industry were among those most at risk from being made redundant without notice, he said.

His comments follow reports from the Labour Ministry that 308 workers returned to Bangkok from their New Year holidays to find their companies had closed, citing the economic crunch.

At least 15 other companies employing

more than 2,000 workers being monitored by the ministry may be in financial dire straits and could soon go under.

The ministry said signs of this have emerged as they have stopped their contributions to the social security fund.

Arun Naisawan, the labour union chairman of Saint-Gobain Sekurit Co Ltd, claimed 56 employees at the tempered glass firm had been dismissed without notice.

Bandit Chotipala, the labour union chairman of Bangkok Eagle Wings Co Ltd, said 25 workers were dismissed unfairly and they planned to complain to the Labour Relations Committee of workers.

The recession was cited by the auto parts firm as the reason for the lay-offs.

Thawee Derying, president of the Thailand Council of Industrial Labour, warned that as long as businesses did not comply with Labour Ministry guidelines on running their operations during the economic crisis and abused the labour law, demonstrations by workers unfairly treated by employers would definitely become a common sight.

## SANTIKA BLAZE

## Survivor to sue pub owners

SURASAK GLAHAN

A survivor of the Santika pub blaze on New Year's Day says he will file consumer suits against the club's owners and authorities.

Santisuk Marongroee, an ASTV host, said he had approached the Lawyers Council of Thailand to act on his behalf in the cases.

Mr Santisuk said he would not seek negotiations, but would file consumer cases against the club for not following safety standards and against the police and Watthana district for failing to ensure the measures were adhered to.

Mr Santisuk said he had been undergoing hospital treatment since the blaze suffering from a stress-related illness and respiratory problems.

He will demand damages for personal

injuries as well as psychological trauma, he said at a seminar on the Consumer Case Procedure Act 2008 at the National Economic and Social Advisory Board's office.

The new act enables consumers to file charges at a civil court against business operators for damages caused by services or products provided by the operators.

The process is much faster than other civil case procedures, and the burden of proof falls on the business operator.

Layover Chairat Saeng-arn, a representative of the council, said victims of the blaze had already sought legal help from the council.

Once the cases are filed as consumer suits, the club's owners will have to prove their security measures met the required standard.

## BREAKTHROUGH

## Baby born to parents suffering thalassemia

SUBIN KHEUNKAWE

**CHIANG MAI:** In a first for Thailand, a healthy baby has been born using embryo selection to a couple who both suffer from the genetic blood disease alpha thalassemia.

The birth is only the second in the world in which the embryo selection technique has worked in a case where both parents have alpha thalassemia, an acute form of the disease where patients can develop severe anaemia.

It gives hope to couples suffering from anaemia which leads to difficulties in them having children.

The baby often dies while the mother is pregnant or if she does manage a successful delivery, it may have a dwarf body and an unusually large head and be mentally retarded.

However, with embryo selection, doctors can choose the desired embryos after the fertilisation of the mother's egg with the father's sperm outside her body, known as in vitro fertilisation (IVF).

Only one perfect embryo is selected to develop into a baby with no physical and mental disorders, explained Wiravit Piyamongkol, of the Department of Obstetrics and Gynaecology at Chiang Mai University, which assisted in the baby's birth.

The team used embryo selection, or "pre-implantation genetic diagnosis" as it is known to doctors.

Dr Wiravit said his team looks at the DNA of between eight to 10 embryos before selecting a perfect one to be implanted into the ovary of the mother.

He led the team to help the couple who suffered from alpha thalassemia but who wanted a child.

Dr Wiravit said his team had to work at the "nan" level, as the DNA (one nanometre is a billionth of a metre).

"We are pleased to say we have the first male baby born through this technique," said Watana Sawachareon, director of Maharaj Nakhon Chiang Mai hospital, who is a team member.

The baby, named Prem, was born on Oct 2 last year.

He and his mother Anchalee Kanthamarat are now both very healthy, Dr Watana said.

Mr Anchalee had been pregnant twice before, but her pregnancies were terminated due to her alpha thalassemia.

Although the embryo selection technique has proven successful, the treatment is costly. Couples have to pay between 300,000 and 500,000 baht, Dr Watana said.

## INBrief

## Net suspect nabbed

**BANGKOK:** A man suspected of distributing online content offensive to the royal institution was arrested in Nakhon Phanom yesterday, the chief of the Department of Special Investigation said.

Poi Col Thawee Sodsang said the suspect was identified as Suvichai Fak, 35. He was arrested in a market in Muang district where he had gone into hiding at a relative's house.

The arrest followed an earlier police raid on his house in Kanyasap district of Bangkok.

Mr Suvichai denied the charge and was brought to Bangkok to be interrogated.

## Law in courts

**FOREST LAW:** Booklets on forest laws will be distributed to raise public awareness about illegal encroachment under a project initiated by IBRI Princess Bajrakitiyabha.

Permanent secretary for justice Kintipong Kitayarak said the princess came up with the idea to hand out booklets with cartoon characters to improve people's understanding of the forest laws.

Mr Kintipong said some villagers encroached on forests without realising they were breaking the law.

## Judge frees Saxena

**VANCOUVER:** A Canadian judge has granted fugitive Thai banker Jakkh Saxena release from custody on pending a judicial review of his case but expressed frustration over the many years the case has been winding through Canadian courts.

In a ruling released on Tuesday, Justice Edward Chausson noted that it has been 12 years since Mr Saxena was arrested in British Columbia on an extradition warrant from Thailand.

Mr Saxena was charged in Thailand with looting about 2.3 billion baht from the Bangkok Bank of Commerce. It alleged the fraud partially precipitated the bank's 1995 collapse and led to the Asian financial crisis of 1997. **AP**



Thailand's biggest business daily

## THE NATION

nationmultimedia.com THURSDAY, January 15, 2009 / 52 PAGES, 3 SECTIONS, VOLUME 34, NO 52113 / Bt25

NEW  
DAILY  
CLIPPING  
Bangkok  
+ Guangzhou  
(China)  
from  
THB  
999  
For more information  
www.asia.com  
Air Asia.com



Fancy some risotto?  
John 'Ik' in his TV kitchen  
every Saturday, PAGE 6

**DAILY Xpress**

Inside today

**BUSINESS**  
**Auto slump seen:** The Thai automobile market is expected to fall by 15 per cent this year, according to Toyota Motor Thailand, which has already announced that it will indefinitely delay construction of a Bt5.4-billion pickup-truck diesel engine plant, originally scheduled for completion in 2010. **PAGE 2A**

**Lower CBD prices:** Land prices in Bangkok's central business district have already begun to drop 20-30 per cent following reduced demand, Sahatchai Kwanchuen, vice president of property firm Harrison, said yesterday. **PAGE 5A**

**AUTO**  
**New image:** We're different, and our new stuff is really good. In a nutshell, that's what General Motors, Ford and Chrysler are trying to tell consumers - and taxpayers - as they roll out an array of new vehicles at the North American International Auto Show. **PAGE 7A**

**BYTELIFE**  
**Indochina hub:** Thailand's Inter-University Network, or UniNet, is aiming to become the research and educational network hub for the entire Indochina region, and will upgrade its backbone infrastructure to 10 gigabits per second within the next couple of months. **PAGE 10A**

**MONEY**  
**Home-loan boost:** You are a salary earner who wishes to have a home of your own one day. But your income so far can only make ends meet each month. Thus, you've never saved up enough for a down payment. Now, it seems that luck is on your side. **PAGE 12A**

**WORLD BIZ**  
**Bartz helms Yahoo:** Veteran Silicon Valley executive Carol Bartz took over the helm of Yahoo yesterday, vowing to revive the ailing Internet firm and calling on critics to give it room to breathe. **PAGE 6B**

**Deficit shrinks:** A sharp decline in the US November trade deficit reflected a record drop in imports from China and a sharp contraction in global commerce, according to government data. **PAGE 7B**

## PRIME MINISTER'S GOAL

## GRAND RECONCILIATION THROUGH SOCIAL JUSTICE AND RULE OF LAW

Abhisit vows to be neutral, heal divisions in society and overcome financial hurdles

THE NATION

Prime Minister Abhisit Vejjajiva yesterday said the country needed social justice and the restoration of the rule of law to achieve "grand reconciliation" and overcome the challenges posed by the fallout from the global economic and financial crises.

In a 30-minute speech delivered to the Foreign Correspondents' Club of Thailand at the InterContinental Hotel, Abhisit was confident, reflective and at times humorous in talking about his "incredibly difficult tasks" in uniting a divisive society and bringing justice to those who have suffered from various ills.

He said his top priority was to get the political system working again and restoring the rule of law. "The authorities should not look at their names but their actions," he said, adding that he would prove the critics wrong in saying that he could not be neutral and treat everybody equally under the law.

The prime minister said that things were beginning to return to normal. He was also delighted that last weekend's by-election results had given a boost to his government.

Abhisit said he was not worried about the coalition's numbers in Parliament. If the government fails to deliver, he pointed out, then there is no reason for it to continue to govern. However, he said if the government can deliver, then there is no reason to change.

He revealed that the government is setting up a new



PRIME MINISTER Abhisit arrives at the Foreign Correspondents' Club dinner at the InterContinental Hotel for his speech last night.

mechanism to scrutinise cases of injustice, both individual and collective. This mechanism will comprise knowledgeable and neutral people who have an understanding of the political and human-rights situation in Thailand

over the past few years.

He said his economic stimulus package would put money into the pockets of the public, so that the economy won't labour in a state of decline. He expects the stimulus measures to show results in the second

and third quarters.

"I believe in my country and my people. Our character is very clear; it is our resilience. We have come through many crises in the past, so there is no reason we cannot do it again," he said.

He added that as prime minister he would have to earn the respect and cooperation of the public. "I am confident that I can earn it through my hard work, my education and honesty."

About 500 people, includ-

**"I believe in my country and my people. Our character is very clear; it is our resilience. We've come through many crises in the past, there is no reason why we cannot do it again."**

ABHISIT VEJJAJIVA  
PRIME MINISTER

ing members of the diplomatic community, showed up at the event organised by the Foreign Correspondents' Club of Thailand.

On Tuesday, Abhisit met with the representatives of the media. He reiterated that his government would not interfere with media liberty and freedom of expression.

The prime minister managed to avoid some 30 red-shirted anti-government protesters who had gathered outside the InterContinental Hotel last night to throw eggs at him.

Somyos Pheuksaksasem, a leader of the red shirts, said his group would continue their egg-throwing campaign until the end of February, when they would start using rotten eggs for politicians from the ruling Democrat Party.

NATIONAL AFFAIRS / 1B, 2B

## MPC MAKES FURTHER CUT IN POLICY INTEREST RATE TO 2 PER CENT

The MPC signalled that an improving political situation would 'enable the government to implement its stimulus measures going forward'.

ANOMA SRISUKKASEM  
THE NATION

The Monetary Policy Committee (MPC) yesterday cut its key policy interest rate 0.75 percentage point to 2 per cent, the lowest since January 2005.

It expects the two consecutive instances of this "front-loading measure" to help boost economic growth by lowering financing costs and putting business and consumer confidence back on track.

LOW GROWTH / 12A

Private consumption and investment will remain weak, because the effects of the government's new economic-stimulus package will take

some time to materialise - about the second half of the year.

The minutes of the MPC meeting cited a contraction in Thai exports, softening domestic demand and delayed fiscal stimulus as perhaps tilting the balance of risk unevenly to the side of growth.

"While we don't think lower policy rates will be a 'magic bullet' to dispel these threats to growth, easing of the policy rate could provide an interest-rate

environment that would allow credit demand and supply to lead to favourable credit outcomes while discouraging household savings via real interest rates," Citigroup said in a report yesterday.

The MPC signalled that an improving political situation would "enable the government to implement its economic-stimulus measures going forward".

"Clearly, policy-makers have signalled the urgency of

having the fiscal-stimulus programme cushion downside risk to growth. While easing the rate will make a definite contribution, the effect will not be the same as having a stronger fiscal-spending intervention," Citigroup said.

"We continue to expect the overnight rate to drop to 1.5% as a fitting end to the rate-tightening cycle. There is an increasing likelihood that this will come in the next scheduled MPC meeting on February 25."

Shape your Future

College of Management, Mahidol University

Now Open for Applications

## Master of Management

(International & Thai Programs)

• Open House: Jan 18, 2009 • Apply by: Jan 31, 2009

Call Center 0-2206-2099 [www.cmmu.mahidol.ac.th](http://www.cmmu.mahidol.ac.th)



## NATIONAL AFFAIRS

## ENFORCING THE LAW EQUALLY WOULD CREATE A BETTER IMAGE

The government will have wasted much of the Bt325 million budget allocated to restore the country's image if it is not able to repair the nation's internal systems so that they function properly.

As part of a Bt116 billion stimulus package, the Foreign Ministry was assigned as the main force to present a good image of Thailand to the international community. The goal is to rebuild confidence among tourists and investors in Thailand and ultimately have them put money back into the country. The foreign ministry would mobilise resources from agencies including the Commerce Ministry, Finance Ministry, Tourism Authority of Thailand and the Board of Investment to do the job. An urgent feature of the plan is

to restore Thailand's image in the major high purchasing power markets including China, Japan, Russia and the United Arab Emirates, according to spokesman Tharit Charungvat. The first act is to stage a series of road shows in targeted markets and launch an advertising campaign to promote tourism and investment in Thailand.

However, judging by what the spokesman told reporters at the ministry on Tuesday, it seems the government does not have a clear idea of how the country should be seen from a foreign perspective, not to mention what kind of image the country should project.

Foreign Minister Kasit Piromya has instructed its embassies and consulates to survey opinions and

## BURNING ISSUE

## COMMENT &amp; ANALYSIS

## SUPALAK GANJANAKHUNDEE

perceptions of foreigners toward Thailand. The minister hoped information would help his team find a starting point on how to best restore confidence in Thailand, spokesman Tharit said. Thailand used to have a good reputation in many aspects until the military coup in 2006. Politically and economically speaking, the country was regarded as a free and democratic nation with a certain degree of stability and rule of law. It could

provide a good environment for doing business and tourism. Members of the People's Alliance for Democracy and Minister Kasit may argue that it was former premier Thaksin Shinawatra who began to destroy Thailand's good image due to corruption, conflict of interest and abuse of power during his tenure. Unfortunately, such blame cannot be justified as long as elements of Thaksin's regime remain in the government. Who can guarantee how many

politicians backing Abhisit Vejjajiva's Cabinet are free from corruption?

Moreover, attempts to correct Thaksin's mistakes brought dire repercussions for Thailand with street protests, the coup and more protests causing chaos.

Changing government in an undemocratic way reflected failure in the parliamentary system. Using judicial activists to rule many cases against the former prime minister and dissolve political parties raised doubts about Thailand's adherence to the rule of law and the strength of political institutions.

A military-installed government, and two elected administrations last year not only failed to get the country back on track, but in

many cases caused more damage to the system as they used all mechanisms to fight each other. This has shown the international community they are prepared to exploit all means, even at the expense of the national interest, to defeat their opponents. The idea of seizing airports to bring a government down is unacceptable to the international community.

Spending money on road shows or expensive ads in international media cannot sustain confidence as long as authorities interpret and enforce the law with many standards and different practices. Before paying a single baht of tax money to "fix" the country's image, the government should show our system works by trying to enforce the law equally to all.

## ANTI-CORRUPTION BODY

## SUPARAT'S FUTURE CLOUDY AFTER RULING

Appointment of four Revenue deputies was criminal: NACC

HASSAYA CHARTMONTRI  
THE NATION

Permanent secretary of Finance Suparat Kawatkul and four former officials committed criminal offences in unlawfully appointing four deputy directors-general for the Revenue Department, according to a ruling by the National Anti-Corruption Commission (NACC).

In a majority vote, the commission also found Khunying Tipwadee Mekasavan guilty of a grave disciplinary offence for related wrongdoing while serving as secretary general of the Office of Civil Service Commission (OCCS) in 2001.

By law, a guilty verdict from the NACC in such cases requires that officials be dismissed or fired within 30 days.

"The NACC issued the resolution on Tuesday," NACC member and spokesman Klanarong Chanthik said yesterday. "Suparat was found guilty of a criminal offence as well as a grave disciplinary offence."

He said NACC was going to inform Suparat's supervisor of its verdict to ensure he received disciplinary punishment. "We will also forward the case to the Attorney General for criminal prosecution," Klanarong said.

Finance Minister Korn Chatikavanij said he would look into the details from the NACC before taking any action.

Of the guilty officials, only

Suparat remains in the civil service.

Guilty in the same case were Somchaiyuk Engtrakul, then permanent secretary for Finance, Sommai Pasi, then deputy permanent secretary for Finance, Veera Chaiyaphan, then an adviser at the OCCS, and Methee Pamaranont, then an OCCS representative at the Finance ministry.

Klanarong said Tipwadee introduced extra measures for selecting officials for 9-level posts by herself, despite the fact there was a Cabinet-approved guideline in place.

The additional measures later allowed Somchaiyuk, Sommai, Veera and Suparat - then director general of the Revenue Department - to appoint favoured officials as deputy director generals of the Revenue Department.

Methee played a role in supporting the officials in their illegal move. A senior official at the Department had lodged a complaint with the Administrative Court over the move.

"The Supreme Administrative Court ruled that the appointment of the deputy director generals was illegitimate because there were grounds to believe the selection panel intended to appoint their favoured people from the very beginning," Klanarong said.

An informed source said the Central Administrative Court had also revoked the appointment order and ordered that the four deputy director generals return to their old positions or equivalent posts.

Suparat was found guilty of a criminal offence as well as a grave disciplinary offence."

KLANARONG CHANTHIK, SPOKESMAN OF THE NACC



## WIPO HONOUR FOR HM THE KING

HIS MAJESTY the King graciously accepts the Global Leaders Award from the World Intellectual Property Organisation director-general Francis Gurry yesterday. His Majesty, the first recipient of the award, was honoured for his remarkable contribution to intellectual property.

## GOVT LIFTS ELIGIBILITY FOR ALLOWANCE

DUMIRONGPAN JAIHOW  
THE NATION

The monthly salary ceiling for employees eligible to get the one-off Bt2,000 payment from the government has been lifted to Bt14,999, from the original Bt14,000.

"We have raised the ceiling because we want the allowance to

cover more people," Labour Minister Phaitoon Kachong said yesterday. He said Deputy Prime Minister Korbak Sabhavas, who oversees economic affairs, had already approved the adjustment.

Phaitoon said up to 8.13 million employees, all members of the social security scheme, would be eligible for the special allowance.

Asked about the 23 million people not in social security schemes, Phaitoon said they would be discussed at the next Cabinet meeting.

Commenting on the allowance, Assoc Prof Nareng Phetpraset said while the government would have to shell out Bt18 billion to pay the allowance, the Bt2,000 could hardly help low-income employees.

## BABIES CAN BE BORN FREE OF THALASSEMIA

KWANDAO JITPANA  
THE NATION  
Chiang Mai

The first baby in Thailand to be born free of alpha thalassemia thanks to new embryo-screening technology was introduced to the public yesterday.

Pakornwich Khanthanarat, now three months old, escaped the risk of being affected by this degenerative blood disease with the help of new technology developed by Chiang Mai University's Faculty of Medicine. The invention is said to help reduce the risk of the disease by 99 per cent.

Maharat Chiang Mai Hospital director Dr Wattana Navachareon told reporters yesterday that thalassemia was a widespread problem



in Thailand, and children born with this disease caught infections easily and generally grew at a slower level.

The team led by Dr Worawit Piyamongkol and Dr Theeraporn Wuttayawanich succeeded in screening embryos for alpha thalassemia, the severest form of the disease, for the first time in Thailand.

The disease is most prevalent among Southeast Asians, and in Thailand, especially in the upper North, about 250 out of every 1,000 people have thalassemia or are carriers. Chances of a carrier's offspring getting the disease are very high.

Wattana said a foetus with alpha thalassemia could either die in the womb or develop heart failure or swelling on being born.

Now parents have a 99 per cent chance of delivering a baby free of the disease provided the mother-to-be is supervised with the new technology.

The first mother to make use of the technology was civil servant Anchalee Khanthanarat, mother of the bouncing boy Pakornwich.

Even though the screening costs Bt200,000, and is not covered by the universal health scheme, 20 couples have already applied.

## WE DO NOT CONDONE USE OF TORTURE, SAYS ABHISIT

SUPALAK GANJANAKHUNDEE  
THE NATION

Prime Minister Abhisit Vejjajiva yesterday rejected accusations by Amnesty International that security forces engaged in systematic torture in the deep South.

The London-based AI released a report on Tuesday that alleged Thai security forces "systematically" relied on torture and other cruel, inhuman or degrading treatment in a bid to obtain information.

The report was based on testimonies from torture victims compiled between mid-2007 and mid-2008.

But Abhisit said: "I want to reassure you that [torture] is not government policy and it was not carried out systematically. The Thai government does not support extra-judicial power," he said.

The PM said he would investigate if there were extrajudicial practices by security forces fighting the insurgency, but he also questioned the accuracy of the report.

He also cited the case of an inquest last month, which ruled that a Muslim leader died after a beating by soldiers while being interrogated, as an example that showed the authorities did not tolerate or cover up torture.

Abhisit is due to make his first visit to the South on Saturday since becoming PM. He has already called for an increase in economic and cultural solutions to try to end the unrest.

"We must win the hearts and the cooperation of locals, otherwise we will merely stay with the same situation," he said.

Meanwhile, Foreign Ministry spokesman Tharit Charungvat said the report, compiled by Benjamin Zawacki, failed to establish all cases to make the claim that torture was conducted systematically.

"The government does not condone in any way, any acts that constitute the use of torture in violation of our law and Constitution," he said.

Thailand has been a party to the Convention Against Torture and Other Cruel, Inhuman or Degrading Treatment or Punishment since 2007. That was an international obligation which required the authorities to investigate all reported cases [of torture], he said.

Last month, a Narathiwat court ruled that soldiers tortured Imam Yapa Kaseng to death during interrogation. That ruling suggested the authorities did not support a "culture of impunity," Tharit said.

## Democrats up fire security

The Democrat Party yesterday installed 50 fire-extinguishing balls across the party's headquarters and leaders' offices to boost security and safety measures.

Party director Nattapol Theepsuwan said the so-called Elide fire-extinguishing balls weigh 1 kilogram each, and can put out a blaze within three to 10 seconds of reaching the fire's source. The balls were installed in the offices of Prime Minister Abhisit Vejjajiva, party chief adviser Chuan Leekpai, secretary-general Suthep Thaugsuban and all party deputy leaders, as well as the party reporters' room.

Meanwhile, 20 "red shirts" gathered outside the Democrat Party's head office to protest against PM's Office Minister Satit Wongrongtaey and his plan to close community radio stations and websites that convey messages viewed as insulting to the monarchy.

The protesters also attacked the government for appointing People's Alliance for Democracy leaders, such as Kasit Piromya as foreign minister, and others as ministry advisers - accusing them of involvement in the siege of Bangkok's airports and Government House. The red shirts dispersed after Nattapol accepted their complaints. - THE NATION

difficult?

an easy way to search for news published more than 10 year ago  
visit [www.nationmultimedia.com/search](http://www.nationmultimedia.com/search)

THE NATION

easier

## News Search



ป.ป.ช.ฟันวินัยร้ายแรง'ทิพาวดี-ปลัดคลัง' > หน้า 16 เล็งสอบ'พินันชา'หวั่นปิดข้อมูลเอสอีซี > หน้า 17



bangkokbiznews.com

# กรุงเทพธุรกิจ

บินจาก กรุงเทพฯ + บาห์ลี (อินโดนีเซีย) 1,499 บาท

ปีที่ 22 ฉบับที่ 7420 วันพฤหัสบดีที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2552

ราคา 20 บาท

ดูดีมีค่า  
จาก...  
หรือ...  
8

สัมภาษณ์  
สุกสิณี รักสิริ  
ผลงานโลก  
ออนไลน์-ออฟไลน์  
8

ภูมิภาค 14  
จับตาตงหาง  
เฉียงใหม่  
ภายใต้ปัจจัยลบ  
รอบด้าน

HR&Management  
ผลิตใบ'สมมติเวช'  
สุขภาพ  
ความผูกพัน  
30

ดัชนีชี้วัดเศรษฐกิจสำคัญ		ดัชนีชี้วัดเศรษฐกิจสำคัญ	
ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552	ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552
ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552	ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552
ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552	ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552
ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552	ดัชนีราคาผู้บริโภค	14 มกราคม 2552

## กรม.ทุ่ม1.2หมื่นล.อุ้มสินค้าเกษตร

นายกฯนัดอภิปรายเนชั่น  
ระหว่งโลกที่ท้าทาย เตรียม  
ปรับแนวทางปี53  
เน้นลงทุน สศช.คาด  
จีดีพีโต 2-2.5%  
กรม.ทุ่ม1.2หมื่นล.อุ้มสินค้าเกษตร



ธปท.ลดดอกเบี้ย0.75%  
พยุหศึก.ก่อนคลังเห็นผล  
แบงก์ชาติปรับลดดอกเบี้ยนโยบาย  
0.75% จาก 2.75% เหลือ 2% ส่งผล  
สัญญาณอัตราดอกเบี้ยลดลงเป็น  
ครั้งแรกในรอบ 2 ปี...

อ่านประกอบ  
จัดแจงงบ 1.16 แสนล.  
ด้านประกันสุขภาพ...2

Exclusive  
สัมภาษณ์  
วิมุต วานิชเจริญธรรม  
กระตุ่นคอง.ต้องมีจุดหมาย  
การให้เงินกระตุ้น  
เศรษฐกิจรัฐบาลต้องไม่  
มุ่งหมาย เพราะเงินมีต้น  
ทุน จึงต้องพิจารณา  
และนำมา  
วิเคราะห์  
เศรษฐกิจ  
ให้ชัดเจน  
(หน้า 17)

## ดีแทคจ่อฟ้องกสทศบุคลล้น800 แจกทรูมูฟผิดสัญญาสัมปทาน

ดีแทค เล็งฟ้องศาล กสทศ นำคดีไม่  
สัญญาสัมปทานให้ทรูมูฟฟ้องต่อ ส.ค.ต.  
ทรูมูฟ ประกาศความร่วมมือ 30  
สัญญาในหลายเขต กสทศ. คาด  
สัญญาจะไม่มีผล...  
ดีแทค เล็งฟ้องศาล กสทศ นำคดีไม่  
สัญญาสัมปทานให้ทรูมูฟฟ้องต่อ ส.ค.ต.  
ทรูมูฟ ประกาศความร่วมมือ 30  
สัญญาในหลายเขต กสทศ. คาด  
สัญญาจะไม่มีผล...

โตโยต้าชี้ตลาดรถ15%  
ส่งออกถดถอยกระทบผลผลิต  
โตโยต้า ชี้รถยนต์ดีเซลใหญ่  
อันดับ 1 ของโลก ระบุวิกฤติ  
เศรษฐกิจโลกปีนี้น่าหนักกว่าปี 2551  
ส่งผลกระทบต่อผลผลิตการผลิตรถยนต์ได้...  
โตโยต้า ชี้รถยนต์ดีเซลใหญ่  
อันดับ 1 ของโลก ระบุวิกฤติ  
เศรษฐกิจโลกปีนี้น่าหนักกว่าปี 2551  
ส่งผลกระทบต่อผลผลิตการผลิตรถยนต์ได้...

โอนเงินไว รับง่ายตาย แบบไม่ใช้บัญชี  
กับ Easy-Cash Transfer  
ให้การโอนเงินเป็นเรื่องง่าย  
ด้วยบริการโอนเงินจากธนาคารมา  
ง่าย, รับเงินทันทีแค่มีบัตรประชาชน  
ส่งตัว...ก็ได้จากทุกสาขาธนาคาร  
ไม่ต้องมีบัญชีกับ-โอนได้  
ปลอดภัย...ด้วยรหัสลับการโอนที่เฉพาะคุณ  
บัญชี...ด้วย SMS รายงานการโอนเงิน  
ส่งงบรายสัปดาห์เป็นบัตรธนาคารจากทุกสาขาทั่วประเทศ  
บัญชี...ไม่ต้องมีบัญชีกับ-โอนได้  
ปลอดภัย...ด้วยรหัสลับการโอนที่เฉพาะคุณ  
บัญชี...ด้วย SMS รายงานการโอนเงิน  
ส่งงบรายสัปดาห์เป็นบัตรธนาคารจากทุกสาขาทั่วประเทศ















SHOW	Program 4: <b>Colorful Korea</b>
นักแสดง	(ราคา 35,900)
นักแสดง	<b>พิเศษ HI JUSEP SHOW</b>
นักแสดง	ทั้ง 2 รายการนี้จะมีนักแสดงพิเศษมาร่วมแสดงด้วย
นักแสดง	● พะราวดวงโยธวาทิต - พิธีกรในทีมที่ 1 กับ
นักแสดง	● กลุ่มนาฏศิลป์ราชบัณฑิต (Cable Car) - เกาะนามิ
นักแสดง	● โซล พาร์คเวสต์ - พิธีกรในทีมที่ 2 และ, วิดีโอเกม
นักแสดง	(โปรแกรมพิเศษที่ 1 จะไม่รวมค่าเช่ารถจากเกาหลี ครับ)
นักแสดง	● หมู่บ้านโบราณริมทะเล - เกาะยอนโด, ซ็อลยอง











★ ตอจากหน้า 1

จากเมื่อครั้งก่อน... (Text continues from previous page)

... (Text continues)

★

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

★ ตอจากหน้า 1

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

★

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

★

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

★

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

★

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)

... (Text continues)



เจาะใจ 'ปู-ไปรยา' ของดเรื่องรัก ออกตัวไม่ใช่ปาร์ตี้เกิร์ล..หน้า 28

# เดลินิวส์

ฉบับที่ 21,645 วันศุกร์ที่ 16 มกราคม พ.ศ. 2552  
www.dailynews.co.th ราคา 10 บาท

## มือเบสแต่งร้อง โดนปิ่นหัวข้อม

“จตุพร” สันหลังัญญา น.ช.นิตยมนุญใหญ่  
เร็ว ๆ นี้แน่นอน สับเหล็กครม.ได้เขี่ยตั้งแบก  
พอม. เป็นที่ปรึกษารัฐมนตรี ◆ อ่านต่อหน้า 14



ชัชชาติปิ่นหัวข้อม... นิตยมนุญ น.ช.นิตยมนุญใหญ่... (Caption text is partially obscured and difficult to read fully, but mentions the names of the individuals in the photo.)

**เผย 42 จังหวัด  
เจอภัยหนาว  
เร่งช่วยเหลือ**  
ป.ค.เผย 42 จังหวัด  
478 อำเภอ 3,105 ตำบล  
38,081 หมู่บ้าน ประสบภัย  
หนาวฉุกเฉิน เร่งช่วยเหลือ  
ด่วน แจกเครื่องกันหนาว  
รัฐได้ ◆ อ่านต่อหน้า 14

## ปรก.บ้านนาถเฮ รัฐบาลเอาใจอีก ให้ค่าครองชีพ!

ข้าราชการบ้านนาถกว่า 2 แสนคนทั่วประเทศ  
ได้เฮ รัฐบาลเอาใจให้เงินค่าครองชีพ 2,000  
บาทด้วย ด้านกรมฯ เผย “จตุพร” แจง  
ให้เป็นเชลยสงครามถึงบ้านหลังถูกพม่ายึด  
ขลุ่ยใช้ ชีวิตต้องเงินเดือนค่าเช่า 15,000 บาท  
เท่านั้น ได้รับเงินเดือน 3,000 บาท ◆ อ่านต่อหน้า 2



๒ รัฐบาลจีน... แผนที่จุดชมสุริยุปราคา (ภาพซ้าย) แนววงแหวน เริ่มที่พม่าผ่านจันทบุรี เวียดนามลงใต้ของ  
ญี่ปุ่น ตรงกับวันที่ 28 ม.ค. หรือในฤดูร้อน โดยประเทศไทยจะเห็นเพียงบางส่วน (ภาพขวา) ฟ้าขึ้น (ช่วงหน้า 15)

# สลดมาเหล็กขยี้รถนร. ตาย 9 ศพ สาหัส 4 ศพ

## ปปช.เชือดทิพาดี ผิดวินัยร้ายแรง

## พ่อ-แม่เศร้าร้องระงม แฉรถไฟไม่มีแผนกั้น!

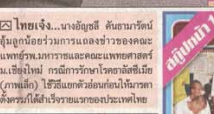
“จตุพร” รถไฟดีเซลขบวน 9 ศพ ขยี้ร่างหนู  
น้อยวัยประถม-มัธยม ดับสองพร้อมคนขับรวม 9 ศพ เจ็บอีก 37  
ราย พ่อแม่รู้ข่าวให้ทำศพเป็นสายเลือด เผย ◆ อ่านต่อหน้า 15



## ‘พรรคภูมิใจไทย’ เปิดตัวกันศึกคัก สส.วันแรก 32 คน



## แพทย์มข.แจ้ง ได้ทราบปลอด โรคซาล์วซีเมีย



## มาโหด 2 นักเรียนหญิง



## ทั้งคู่ยอดกตัญญู ทำงานเด็กเสิร์ฟ! หลังจากเลิกเรียน

แม่ปวดคอ แม่พ่น นักร้องสาว  
ดับสอง 2 ศพ !!! สุดเศร้านักเรียน  
ยอดกตัญญู ออกทำงานเป็นเด็กเสิร์ฟ  
หลังเลิกเรียนเลิก ◆ อ่านต่อหน้า 15

## จับตาสถานการณ์ ‘พร-ปลอมบวช’ เศรษฐกิจแย่..ยิ่งเพิ่ม!

๒ มาเหล็กขยี้... จม.ตรวจพบรถโดยสาร  
บรรทุกผู้โดยสารที่บริเวณจุดเกิดเหตุถูกไฟไหม้  
บริเวณทางแยก 77 สายทางพลา-ศรีสะเกษ  
ผู้โดยสารที่ขึ้นรถโดยสารที่บริเวณทางแยก 77 ทางแยก  
และ ส.ม.ท. 8 อำเภอพลา จ.สุรินทร์ ทำให้  
นักวิชาการวิเคราะห์ถึงสาเหตุการชน

## จับวายร้ายระดับโลก หนีกับดานไทย

แก๊งค์ขโมย-ตำรวจจับ  
เมืองจันทบุรี ร่วมกันบุก  
เสียบขี้เหล็ก 2 แสนล. รวบรวม ◆ อ่านต่อหน้า 3

## โจรได้ลอบระเบิด ด่านสุโขทัย-ตาก เข้าตรวจ-บั้งขี้

แนวร่วมบ้านป่าได้ลอบวางระเบิด  
ด่านพรมแดนสุโขทัย-ตาก ลงจ.ก.  
เข้าตรวจจับกุม กองพลตำรวจ  
เข้าอีก 1 ลูก ◆ อ่านต่อหน้า 15







พบกับคอมมิวนิสต์กัน  
กลางสนามนาถนารายณ์ 10...เพื่ออะไร...จริงหรือ?

ขึ้นง่าย ลงยาก 10

รักกับลูกสาว  
นักชกบ็อกซิ่งวัย 20  
รับงาน โดยสุจิต

# ทุ่มอีก 1.2 หมื่นล.จุ่มเกษตร

นอกระบบลุ้นรัฐช่วย  
ย่ำ 2 พันจ่ายครึ่งเดียว

รัฐเตรียมทุ่มอีก 1.2 หมื่นล้าน จุ่มข้าวโพด-ปาล์ม  
น้ำมัน-ยางพารา ย้ำผู้ประกันตน-ชาว.รายได้น้อย  
1.5 หมื่น จ่ายครึ่งเดียว 2,000 บาท เลี้ยงช่วย  
แรงงานนอกระบบ 23 ล้านคน

ณัฐพล 10



พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ พระราชทานพระบรมราชูปถัมภ์ แก่ นายพลากร สุวรรณรัฐ ผู้ว่าราชการใหญ่  
องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ เมื่อวันพุธที่ 14 สิงหาคม 2552 ณ พระที่นั่งอัมพรสถาน พระราชวังดุสิต  
ประกอบพิธีพระราชทานเป็นต้นแบบในการส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแก่เยาวชนไทย  
ณ. เพื่อพระโอรสสายใจ รัชโกศลกุล ณ.พ.น. จ.ประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวันที่ 14 สิงหาคม พ.ศ.2552

# ‘สุรรัตน์’ ทูกริตต่อหน้าที ปปช.สอย ปลัดคลัง

ใส่ออกรางการ  
ทิวาตีพิศวินัย

ปปช.ฟันปลัดคลัง 2 เด้ง ปป.บิต-ละเว้น  
หน้าที่โดยมิชอบฯแลมผิตวินัยทุจริต ชนดะที่  
“ทิวาตี” โดนด้วย ผิดวินัยร้ายแรง แต่งตั้ง  
ซี 9 ผืนมดี กรม.

เพื่อนเนวิน-บ้านาพร  
เปิดพรรค ‘ภูมิใจไทย’

“เพื่อนเนวิน” เปิดตัว “ภูมิใจไทย” เคาะชื่อ 30 ส.ส.ยุ  
ปะชุนานิยมตั้งคม.เป็นเลข อดีต 111 พท.โผล่ร่วมชาน  
ค้นที่ กต.รับรอง “สุเทพ-พัน-20 ส.ส.”

ณัฐพล 10

# น้ำเหือกขยี้เลอะ! รถนักเรียน 7ศพ

บุรีรัมย์ยสของเจ็บอีก 32 คน

น้ำเหือกสายจากภูเขา-ศรีสะเกษ พุ่งชนรถรับส่งนักเรียนหลายคันที่  
6 คน สิ้นใจขณะน้ำสง รถอีก 1 เจ็บ 32 คน แห่จุดเทียนไม่มี  
แสงกับ-สัญญาณไฟเตือน ผู้ว่าฯ-เหล่ากาชาด ครวญเงินช่วยเหลือ  
ครัวเหี่ยวเบียดจนขายละ 3,000 บาท

ณัฐพล 10



แพทย์มช.เยี่ยม  
เพาะเด็กหลอด  
ปลอดโรคเลือด  
อัลฟาธาลัสซีเมีย

แพทย์ มช.คิดค้นการคัดตัวอ่อน  
“อัลฟาธาลัสซีเมีย” สำเร็จครั้งแรก  
เผยช่วยตัดความเสี่ยงการ  
มีลูกเป็นโรคเลือดถึง 99%  
พร้อมเปิดตัว “น้องเปรม” ทารก  
รายแรกที่เกิดด้วยเทคโนโลยีนี้  
กล่าว

ณัฐพล 10

# บังคับบอมนกเขา

แจ้งจับนายจ้างวิเทศ  
ปิดทอนาจารย์เด็ก 12

“ครูขุน” พาเด็กหญิงวัย 12 ปี แจ้งจับนายจ้างบังคับ  
บอมนกเขา แฉขอลู่การแทนพระ กลับพามาเป็น  
คนใช้ วิเทศฯสั่งเปลี่ยนก่อนจับผู้ตกบับใช้ปาก  
สำเร็จความใคร่ เจ้าตัวยังล่องหน

ณัฐพล 10

# ไฟไหม้โกดังฟ้ายา 100ล.

ร.ทอผ้าราชบุรี  
อีกรายตู้ไฟ กสท  
พิทยาไทร-เน็ตล่ม

ไฟไหม้โกดังเก็บฟ้ายาโรงงานทอผ้า  
กัซวาลเท็กซ์ไทล์ จ.ราชบุรี เสียหายกว่า  
100 ล้าน ส่วนที่พิทยา ตู้สำรองไฟฟ้  
กสท ลัดวงจร ครวินโฮม-ลูกคำ  
หนีตาย จะบ.ไพรศัพพะท้าวประพ  
เน็ตเมืองพิทยาคม

ณัฐพล 10

ลาวโซดไลน์  
แสบอานลวอกก็

แสบสาว “โซดไลน์” แสบงานสร้างถึง  
รายได้ดีกว่าลูกค้าร้านถนน สุตนิ  
เวชเดือน เข็กหนุ่มเสี่ยงเอดส์-มะเร็ง  
ปากมดลูก

หน้า 15







(รายละเอียดหน้า 3)



ติดต่อรับคำร้องขอคืนภายในวันที่  
ณภาพที่ ๗ พ.ศ. ๒๕๕๒  
เพื่อให้ทันศาลแขวงแห่งเมืองเบียร์ เซอวาที่ :  
5 Hatikva Street  
Beer Sheva  
รหัสไปรษณีย์ 84893  
4 มกราคม พ.ศ. ๒๕๕๒





**ผลจากการตีคัตว่อน**  
**โรคอัลฟาธาลัสซีเมีย**

คณะแพทยศาสตร์พระบรมหาราชวัง  
ตัวอ่อนได้รับการคัดกรองสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย  
ซึ่งมีรายแรกในประเทศไทย คณะแพทยฯ **ถ่ายทอด 15**

**หลวงปู่หนูอาพาธ**  
**ขอกลับวัดพระสิงห์**  
เผยอาการอาพาธ “พระธรรม  
สิทธิจารย์” ดีขึ้น หลังเข้ารักษาที่รพ.  
สวนดอกเกือบครึ่งเดือนหลวงปู่ขอกลับ  
วัดพระสิงห์



**เผาโกลบอล  
หนีตายรอบ2**

ชาวบ้าน  
แตกตื่น  
วิวาห์  
ชาวบ้านแตก  
ตื่นดูวีรประหลาด  
5 ขาช่วยกันบริจาค  
เงินไว้วัด  
วิวาห์  
ด้านหน้าบ้าน 15



## A group photograph of seven men in military uniforms and one woman in a blue jacket, standing behind a table with various items. The men are wearing different types of camouflage uniforms, some with berets. The woman is seated at the table, which has a white cloth and some papers on it. The background is a plain wall.

คดีสังหารพ่อค้าผลไม้ ผกก.สั่ง  
ตำรวจชุดสืบสวนประกบผู้ต้องสงสัย  
รอลักฐานครบลงมือจับยึด  
ตะรางทันที

**จับยานรก**

สภก.จับกุมได้ 10 ราย ตรวจยึดยาเสพติดและของผิดกฎหมายมูลค่ากว่า 1 ล้านบาท

นางสาวกัญญา (ชื่อจริง) รองนายก อบจ.น่าน พร้อมด้วย นายสมชาย นาคะเกตุ (ชื่อจริง) รองนายก อบจ.น่าน และ นายสมชาย นาคะเกตุ (ชื่อจริง) รองนายก อบจ.น่าน ได้ร่วมกันตรวจยึดยาเสพติดและของผิดกฎหมายมูลค่ากว่า 1 ล้านบาท

IN THE HEART OF THE CITY



LUXURY LIVING  
IN CHIANG MAI FINES' ADDRESS  
อีกหนึ่งผลงานคุณภาพจาก กลุ่มฟินส์เอส  
เพื่อสร้างสรรคิกรรณภาพอันน่าตื่นตาตื่นใจเมืองเชียงใหม่ "ดี อธิสน์"  
คุณประโยชน์มากมาย ครอบคลุมถึงงานดีไซน์  
ครอบคลุมถึง 5 วัสดุหลัก ได้แก่ 1.5 มม.จาก เสรยเมทัล เท้า เบนเนอเมทัล  
สแตนเลสสตีลใช้สอยภายในบ้าน ได้แก่ 81 Unit TheAthena











พุทธเจ้า รอยพระบาทเกือกนกัวพระ  
อรหันต์ 7 ขวบ **รอยพระหัตถ์** ย่านศอกหน้า 15



2 สพ

เมื่อโลก  
อ่านต่อหน้า 2

นายเป็นที่พึ่งของประชาชนอย่างแท้จริง ให้เป็นความ  
สงบสุขของประชาชนเป็นหลัก

ผู้กรรพ  
อ่านต่อหน้า 2

มอบตัวตำรวจแล้ว  
สารภาพแค้นแสบป็น  
ใจให้รายอื่น.









http://www.chiangmainews.co.th ติดตามรับฟังคลื่นของคนข่าว 99.5 เมกกะเฮิร์ต อัปเดตข่าวสาร พร้อมฟังเพลงสบายๆ ตลอด 24 ชม.



# ยึดมหาศาล ไม้สักเถื่อน

**ซ่อนในบ่อน้ำทิ้ง  
โรงทำหมุยป่าปี  
รองผู้ว่าฯสั่งสอบ**  
รองเมืองลำปาง นำกำลัง  
ผสมกัญไม้สัก-ไม้กระยาสูบเถื่อน  
มุดค้นบ่อน้ำทิ้ง โรงทำหมุยซ่อนใน  
บ่อน้ำ 3 บ่อ 5 อำเภอต่อหน้า 2

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จพระราชดำเนินไปทรงประกอบพิธีเปิดศูนย์ฯ พร้อมนำผู้ต้องหา 3 คน และของกลางไม้สัก 10 ลำหนุมานขึ้นเรือ เมื่อวันที่ 24 ก.พ.52



## เชียงใหม่ นิวส์

ฉบับที่ 18 ฉบับที่ 6435 ประจำวันพฤหัสบดีที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2552 ราคา 5 บาท

# ฆ่าหมกลำเหมือง เสียอ.แม่สาย รถแบ็กโฮขาดเจอ

# รวบคาผ้าเหลือง เจ้าอาวาสวัดดง เอเย่นต์ยานรก

**ญาติแจ้งคนหาย  
ตั้งแต่หัวปี 51  
คาดโดนอุ้มเชือด  
ปมขัดธุรกิจเพียบ**  
พบศพนักธุรกิจไทยเมื่อนาย  
ถูกสังหารโหดหมกลำเหมือง สภาพ  
ร่างเหือดแห้งจนมีร่องรอยถูกยิง  
กระสุนฟงทะลุ ทหารเวรกลางปม  
หักหลังธุรกิจ-การเจรจาซื้อขายไม้  
เป็นพยานถูกฆ่าทั้ง 2 แล้วหนีหาย  
เงินหมื่นหมื่นบาท 5 อำเภอต่อหน้า 2



# ขยายผลรวบ แก๊งรถเถื่อน

**รายใหญ่เมืองชม.  
ยึดแก๊งหรืออีกเพียบ**  
รวบหัวแก๊งรถเถื่อนราย  
ใหญ่ของเมืองเชียงใหม่ ไล่ฟันอีก  
1 ราย พร้อมยึด 5 อำเภอต่อหน้า 2

**ลูปหน้า 1**

**นช.แจ้ง!! วิจัยสำเร็จ**  
ศึกษาผลกระทบจากมลพิษทางอากาศ

ทีมแพทย์จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อน  
ทารกโรคอัลไซเมอร์ เป็นครั้งแรกของ  
ประเทศไทยและเป็นครั้งที่ 5 อำเภอต่อหน้า 11

**ไฟฟ้า-คว้นพิษ  
สพ.คนป่วยพุ่งพรวด**

**ลป.-แพร่  
ฝุ่นยังเกิน  
มาตรฐาน**  
ถั่วรับแจ้งเหตุ  
ไฟป่าไหม้ 4 จุด  
พบมีการแจ้งเหตุ  
80 ครั้ง พังเขียง  
ใหม่ ถือว่าลดลง  
5 อำเภอต่อหน้า 2

**หัวหน้าแก๊ง**  
ตำรวจ กก.เบี่ยงโขงใหม่ จับกุมตัวนายสุ่ม รอด พัวพันกับแก๊งรถเถื่อน  
รายใหญ่ของเมืองเชียงใหม่ พร้อมยึดของกลางรถยนต์หรู 4 คัน แดงดำสีเงินได้แก๊งรถเถื่อน  
ตำรวจและนักวิชาการมีมติว่าพบไม้สักขนาดยักษ์ในแก๊งรถเถื่อนกำลังจะถูกรื้อถอนการได้แก๊งรถเถื่อน

**ศึกก่อนเข้าคุก**  
ตำรวจ กก.เบี่ยงโขงใหม่ จับกุมตัวนายสุ่ม รอด พัวพันกับแก๊งรถเถื่อน  
รายใหญ่ของเมืองเชียงใหม่ พร้อมยึดของกลางรถยนต์หรู 4 คัน แดงดำสีเงินได้แก๊งรถเถื่อน  
ตำรวจและนักวิชาการมีมติว่าพบไม้สักขนาดยักษ์ในแก๊งรถเถื่อนกำลังจะถูกรื้อถอนการได้แก๊งรถเถื่อน

**อุตุเตือนเหนือแล้งยาว**  
สัตว์ผอมโซคนขาดน้ำ  
ภาคเหนือแล้งจัด กรมอุตุนิยมวิทยา ออก  
ประกาศเตือนด้าน เรื่องภัยธรรมชาติเนื่องจากปีนี้  
อากาศจะร้อนกว่าเดิมตั้งแต่เดือน 5 อำเภอต่อหน้า 2







CHIANG MAI UNIVERSITY

FACULTY OF MEDICINE



เนื่องในโอกาสขึ้นปีใหม่ พุทธศักราช ๒๕๕๒  
พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงพระกรุณาพระราชทาน อ.ค.อ.  
และพระราชทานพรปีใหม่ แก่ประชาชนชาวไทย ปราศจากทุกข์ ปราศจากโรค  
ปราศจากภัย ให้มีความสุขกาย สุขใจ และความสำเร็จสมหวัง  
ตลอดคฤหาสน์โดยทั่วกัน



ข่าวสาร  
คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Faculty of Medicine, Chiang Mai University ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนกรกฎาคม 2552

[www.med.cmu.ac.th/news](http://www.med.cmu.ac.th/news)



# ทีมแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประสบความสำเร็จคัดตัวอ่อนสำหรับ โรคอัลฟาธาลัสซีเมีย รายแรกในประเทศไทย



รศ. นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล  
อาจารย์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา  
คณะแพทยศาสตร์ มช.

ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้จัดการประชุมวิชาการเชิงปฏิบัติการระดับนานาชาติ “Chiangmai International Workshop on A.R.T.” ระหว่างวันที่ 13 - 16 มกราคม 2552 ณ ห้องประชุมชั้น 15 อาคารเฉลิมพระบารมี โดยมีวิทยากรผู้เชี่ยวชาญในระดับชาติและนานาชาติ เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์เกี่ยวกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ในการทำทารกหลอดแก้วและการคัดตัวอ่อน โดยทีมแพทย์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และถือเป็นครั้งแรกของโลก



รศ. นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล อาจารย์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มช. กล่าวว่า “โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่พบได้มากที่สุดในโลก โดยเฉพาะในประเทศแถบเอเชีย และถือเป็นปัญหาใหญ่ทางสาธารณสุข ปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ทารกที่ได้รับการถ่ายทอดยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จะมีอาการซีดอย่างมาก และเสียชีวิตในครรภ์มารดาที่ตั้งครรภ์ทารกดังกล่าวมีความเสี่ยงสูงที่จะประสพภาวะแทรกซ้อนทางสูติศาสตร์ร้ายแรงถึงชีวิต ได้แก่ ครรภ์เป็นพิษ ภาวะคลอดยาก และภาวะตกเลือดก่อนคลอดและหลังคลอด วิธีในการแก้ไขปัญหาระบาดของโรคธาลัสซีเมียที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบันคือ การตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงที่จะตั้งครรภ์บุตรที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ให้ความรู้และทางเลือกในการวินิจฉัยก่อนคลอด โดยการเจาะตรวจเนื้อรกหรือการเจาะตรวจเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ และทำแท้งทารกที่เป็นโรคชนิดรุนแรง เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับมารดา”

**การคัดตัวอ่อน** Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) หรือการเลือกตัวอ่อน (embryo selection) เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่มีความก้าวหน้าสูงสุด เป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถช่วยให้มารดาที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงเริ่มการตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารกปราศจากโรคดังกล่าว ช่วยให้มารดาไม่ต้องทำแท้งดังเช่นในกรณีที่มีผลการวินิจฉัยก่อนคลอดพบว่าทารกมีความผิดปกติ





## ทีมแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### ประสบความสำเร็จคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียรายแรกในประเทศไทย

การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวนี้กระทำโดยการตัดเซลล์ 1 - 2 เซลล์จากตัวอ่อนระยะวันที่สาม หลังการปฏิสนธิในหลอดแก้วซึ่งมี 8 - 10 เซลล์ แล้วใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ทางอนุชีววิทยาระดับนาโน ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโรคพันธุกรรมอัลฟาธาลัสซีเมียจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว การคัดตัวอ่อนนี้จึงเป็นโครงการที่มีความละเอียดอ่อนและซับซ้อนสูง จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือของผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหลายสาขาวิชา ได้แก่ นรีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลทารกหลอดแก้ว นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลตัวอ่อน นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว และสูติแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลมารดาและทารกในครรภ์

**ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่** ได้ริเริ่มโครงการให้บริการการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคบีตาธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 โดยการสนับสนุนของสภากิจ (วช.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) บริษัท เอโซ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด บริษัทออร์กานอน (ประเทศไทย) จำกัด **ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และเป็นครั้งที่สองของโลก**



ทารกจากการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียรายแรกนี้ เป็นเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2551 น้ำหนักแรกคลอด 3,280 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่า ทารกไม่เป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง



จากการแถลงข่าวความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคอัลฟาธาลัสซีเมียเป็นแห่งแรกของประเทศไทย และเป็นแห่งที่สองของโลก โดยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 14 มกราคม 2552 สื่อมวลชนได้ให้ความสนใจและนำไปเสนอในรูปแบบของสื่อบริษัท และการสัมภาษณ์ผ่านทางสถานีโทรทัศน์ ช่อง 3, 7, 9, NBT, Thai PBS, Nation Channel เป็นจำนวน 14 ครั้ง และพาตัวข้อข่าวหน้าหนึ่งของหนังสือพิมพ์ทุกฉบับ อาทิเช่น หนังสือพิมพ์บางกอกโพสต์ เดอะเนชั่น มติชน กรุงเทพธุรกิจ ไทยรัฐ เดลินิวส์ คมชัดลึก ไทยนิวส์ ฯลฯ ตลอดจนการให้สัมภาษณ์ทางสถานีวิทยุอีกหลายรายการ นับเป็นข่าวความสำเร็จของผลงานการวิจัยทางการแพทย์ที่ได้รับความสนใจจากสื่อมวลชนและประชาชนที่มากที่สุดครั้งหนึ่งของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นับว่าเป็นโอกาสในการประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนตื่นตัวได้รู้จักโรค "โลหิตจางธาลัสซีเมีย" และเผยแพร่ชื่อเสียงของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับวิสัยทัศน์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เน้นมหาวิทยาลัยชั้นนำที่มุ่งเน้นการวิจัย และคณะแพทยศาสตร์ที่เป็นสถาบันทางการแพทย์ระดับมาตรฐานสากล 🙌





เอไอ... ในทุกช่วงเวลาของชีวิต

# Eisai

BONDING THE GENERATIONS

“Eisai”  
คลังความรู้เรื่องยา

“กินดี อยู่ดี”  
อาหารต้านโรค

“วาการิ”  
ชื่อนี้มีแต่ความหวานอร่อย

“ความสำเร็จในการ  
กัดตัวอ่อนโรคแอลฟาธาลัสซีเมีย”  
รศ. นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล



วารสารรายสามเดือน ปีที่ 4 ฉบับที่ 4 มกราคม-มีนาคม 2552

# รศ.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล กับความเข้าใจในโครงการการคัดตัวอ่อน โรคแอลฟาธาลัสซีเมีย

โดย บุญธิดา จิตกฤตธรรม



“โรคแอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่แฝงมาทางพันธุกรรม โดยที่คู่สมรสไม่มีอาการของโรคมามาก่อน แต่ทั้งคู่มียีนที่เป็นพาหะแฝงตัวอยู่ ทำให้บุตรที่เกิดมามีโอกาสเป็นโรคธาลัสซีเมียได้ โดยทั่วไปโรคธาลัสซีเมียที่เจอในไทยจะมี 3 ชนิด คือ แอลฟา เบต้า และอี ซึ่งแอลฟาจะเป็นชนิดที่รุนแรงที่สุด ทารกที่เป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมียอาจเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาหรือเสียชีวิตตั้งแต่แรกเกิด และยังคงอาจเป็นอันตรายต่อแม่ เพราะทารกในครรภ์จะมีอาการตัวบวมทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน ซึ่งก่อนอันตรายต่อคุณแม่ที่อุ้มครรภ์อยู่”

**เมื่อไม่นานมานี้** คนไทยคงมีโอกาสได้ชื่นชมความสำเร็จในการแพทย์บ้านเรา จากกรณีของ ‘น้องเปรม’ ด.ช.ปกรณวิชญ์ คันธามารัตน์ ทารกที่เป็นผลจากความสำเร็จของโครงการวิจัยการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคแอลฟาธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรก

ของประเทศไทยและครั้งที่สองในโลก ภายใต้การดำเนินงานวิจัยโดยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งนำโดยหนึ่งในหัวหน้าทีมวิจัยคือ รศ.นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล จากภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยาที่จะเป็นผู้ให้ข้อมูลกับเราเกี่ยวกับเรื่องนี้

ก่อนอื่นต้องขอให้คุณหมอวีรวิทย์ให้ความรู้เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียกันก่อน “โรคแอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่แฝงมาทางพันธุกรรม โดยที่คู่สมรสไม่มีอาการของโรคมามาก่อน แต่ทั้งคู่มียีนที่เป็นพาหะแฝงตัวอยู่ทำให้บุตรที่เกิดมามีโอกาสเป็นโรคธาลัสซีเมียได้ โดยทั่วไปโรคธาลัสซีเมียที่เจอในไทยจะมี 3 ชนิด คือ แอลฟา เบต้า และอี ซึ่งแอลฟาจะเป็นชนิดที่รุนแรงที่สุด ทารกที่เป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมียอาจเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาหรือเสียชีวิตตั้งแต่แรกเกิด และยังคงอาจเป็นอันตรายต่อแม่เพราะทารกในครรภ์จะมีอาการตัวบวมทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนซึ่งก่อนอันตรายต่อคุณแม่ที่อุ้มครรภ์อยู่ด้วย อาจทำให้เกิดภาวะตกเลือดหรือมดลูกแตก ซึ่งอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ เพื่อความปลอดภัยของคุณแม่จึงต้องดำเนินการทำแท้ง” ฟังแล้วน่าตกใจ แล้วอย่างนี้จะมีวิธีการป้องกันอย่างไร “สามารถทำได้โดยการตรวจภาวะแฝง คำนวณความเสี่ยงที่จะเกิดโรค คู่สมรสจะตรวจหาความเสี่ยงก่อนแต่งงานหรือในขณะตั้งครรภ์ เมื่อวินิจฉัยพบอาจจะต้องมีการทำแท้ง ถ้าไปตรวจก่อนการตั้งครรภ์น่าจะดีที่สุด” คุณหมอชี้แจง

แล้วถ้าคุณแต่งงานที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียทั้งคู่จะทำอย่างไร แล้วเราจะทราบได้อย่างไรว่าทารกที่อยู่ในครรภ์ของแม่จะไม่ใช่โรคดังกล่าว





จากความสำเร็จของโครงการสามารถช่วยเหลือคู่สมรสที่อยู่ชายนี้ได้ ทำให้คู่สมรสมีภาระทางในการมีบุตร และมั่นใจได้ว่าบุตรที่เกิดมานั้นจะไม่เป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมีย แน่นอนว่าความสำเร็จที่ยอดเยี่ยมนี้นคงต้องให้คุณหมอวิริทย์เป็นคนอธิบาย ในขั้นตอนการดำเนินการ “ในขั้นต้นเราจะต้องฉีดยากระตุ้นฮอร์โมนให้กับคุณแม่เพื่อให้ไข่สุก 10-20 ฟอง แล้วจึงนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยง นำตัวอสุจิหนึ่งตัวฉีดลงไปไข่แต่ละฟอง เมื่อปฏิสนธิแล้วจึงนำไปเลี้ยงไว้ 3 วัน หลังจากนั้นจึงนำเซลล์หนึ่งเซลล์จากตัวอ่อนทุกตัวไปตรวจเพื่อเลือกตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรค นำไปใส่ไว้ในมดลูกของคุณแม่ หลังจากนั้นจึงเข้าสู่การตั้งครรภ์แบบธรรมชาติ เมื่อคลอดแล้วเด็กจะปลอดจากโรคแอลฟาธาลัสซีเมีย เรียกได้ว่าเป็นการผสมผสานขั้นตอนการทำเด็กหลอดแก้วกับขั้นตอนการตรวจดีเอ็นเอเซลล์เดียว”

ความสำเร็จในโครงการนี้นับเป็นครั้งที่สองของโลก ทั้งในยุโรปหรืออเมริกายังไม่สามารถทำได้แน่นอนว่าโครงการนี้คงไม่ได้ทำสำเร็จในข้ามคืนกว่าจะมาถึงจุดนี้ได้ต้องพัฒนากันเป็นสิบปีทีเดียว โดยเฉพาะเรื่องของนายยาตรวจเซลล์เดียว คุณหมอวิริทย์รับว่าต้องพัฒนาและคิดค้นมาเป็นเวลานาน และจากการค้นพบนี้สามารถนำไปพัฒนาในด้านอื่นๆ ได้อีกมาก คุณหมอได้กล่าวถึงความสำเร็จในโครงการนี้ว่า “ความสำเร็จของโครงการนี้เป็นทางเลือกใหม่ของคู่สมรสที่เป็นพาหะ และยังเป็นโอกาส

ในการพัฒนาความรู้ด้านเด็กหลอดแก้วและการตรวจดีเอ็นเอเซลล์เดียว รวมถึงประโยชน์ทางอ้อมในด้านการวิจัยตัวอ่อนหรือแม้แต่ทางด้านนิติเวช” จะอย่างไรก็ตามประโยชน์โดยตรงคงตกอยู่ที่ประชาชนทุกคนมากกว่า ซึ่งคุณหมอกล่าวเสริมในเรื่องนี้ว่า “ที่สำคัญคือการตื่นตัวและตระหนักของประชาชนเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากที่สุดของไทย ทำให้คนไทยมีความสนใจที่จะตรวจภาวะแฝงของโรคก่อนการมีบุตร” เชื่อแน่ว่าหลายคนคงรู้สึกว่ารธาลัสซีเมียไม่ใช่เรื่องไกลตัวอีกต่อไป และจากการสอบถามคุณหมอวิริทย์ทำให้ทราบว่าในส่วนของผู้เข้าร่วมโครงการนั้นจะยังคงมีอยู่ ทั้งนี้เพราะโครงการได้รับการสนับสนุนเงินทุนในการพัฒนาและวิจัยทั้งจากภาครัฐและเอกชน รวมถึงจากทางเอชดีด้วย แต่ในอนาคตข้างหน้าอาจต้องมีการเปลี่ยนแปลง เพราะค่าใช้จ่ายในด้านนี้ค่อนข้างสูง รวมถึงการพัฒนาการตรวจดีเอ็นเอเซลล์เดียวสำหรับธาลัสซีเมียแต่ละชนิดนั้นใช้เวลาานาน และจะต้องพัฒนาในด้านนี้ต่อไป

จากความสำเร็จในโครงการนี้นับเป็นของขวัญล้ำค่าแก่คู่สมรสที่มีภาวะแฝงให้สามารถมีบุตรได้อย่างปลอดภัย และที่น่าปลื้มใจไปกว่านั้นคือความสำเร็จในครั้งนี้เป็นความสำเร็จที่มาจากคนไทยด้วยกันเอง ต้องขอขอบคุณคุณหมอวิริทย์ปิยะมงคล และทุกฝ่ายที่มีส่วนทำให้โครงการนี้ประสบความสำเร็จไว้ ณ ที่นี้ด้วย 🙏





## แพทยศาสตร์สาร รายปักษ์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Bi-Monthly Newsletter  
Faculty of Medicine Chiang Mai University

วิสัยทัศน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
เป็นสถาบันการแพทย์ชั้นนำระดับมาตรฐานสากล

พันธกิจ ผลักดันเทคโนโลยีทางการแพทย์ เป็นสากล สร้างสรรค์งานวิจัย  
เพื่อขึ้นด้านสุขภาพ ให้บริการสุขภาพที่ได้มาตรฐาน ทำนุบำรุง  
ศิลปวัฒนธรรมและสิ่งแวดล้อม

พันธกิจ : โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ให้บริการด้านสุขภาพอย่างมีมาตรฐาน ส่งเสริมการศึกษาและวิจัยด้วยวิทยาการที่ทันสมัย  
โดยความร่วมมือร่วมใจของบุคลากรที่มีคุณภาพและคุณธรรม ในสภาพแวดล้อมที่อบอุ่นและปลอดภัย

ปีที่ 10 ฉบับที่ 147 ปักษ์หลัง 16-31 มกราคม 2552 วัตถุประสงค์ เพื่อเผยแพร่กิจกรรมในรอบปีและเชิญชวนผู้สนใจเข้าร่วมกิจกรรม : [www.med.cmu.ac.th/pr/news](http://www.med.cmu.ac.th/pr/news)

## แพทย์ มช. ประสบความสำเร็จผ่าตัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และนับเป็นครั้งที่สองของโลก



คณะแพทยศาสตร์ มช. จัดแถลงข่าวความสำเร็จ  
ของแพทย์ รพ.มหาราชนครเชียงใหม่ ในการตัดตัวอ่อน  
สำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และ  
นับเป็นครั้งที่สองของโลก โดยมี รศ.นพ.วัฒนา นาวาเจริญ  
ผู้อำนวยการ รพ.มหาราชนครเชียงใหม่ เป็นประธานการ  
แถลงข่าว พร้อมด้วย รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต คณบดี  
คณะแพทยศาสตร์ มช. รศ.นพ.ชัยรัตน์ คุณาวิทีกุล  
รองคณบดีคณะแพทยศาสตร์ มช. และทีมแพทย์ภาควิชา  
สูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มช. ซึ่ง  
ประกอบด้วย ศ.นพ.จตุพล ศรีสมบูรณ์ หัวหน้าภาควิชา  
สูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา รศ.นพ.วิรัชชัย ปิยะมงคล,  
รศ.นพ.สมศักดิ์ เขาวงศ์วิเศษ และรศ.นพ.ธีระพร  
วุฒิวนิช ร่วมแถลงข่าว ณ ห้องประชุมชั้น 2 อาคารเฉลิม  
พระบารมี เมื่อวันที่ 14 มกราคม 2552 (อ่านต่อหน้า 3)

## งานวันเด็กแห่งชาติ ประจำปี 2552



คณะแพทยศาสตร์ มช. จัดงานวันเด็กแห่งชาติ เมื่อวันที่เสาร์ที่ 10 มกราคม 2552 ณ ชั้น 1 และชั้น 2 อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์ มช. ทั้งนี้เพื่อเปิดโอกาส  
ให้เด็กได้แสดงความสามารถ พร้อมทั้งได้รับความรู้ทางวิชาการที่สอดแทรกในกิจกรรมต่าง ๆ ให้แก่เด็กที่มาร่วมงาน โดยมี รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
มช. เป็นประธานเปิดงาน (อ่านต่อหน้า 2)

## ขอแสดงความยินดีแก่บัณฑิตแพทย์ รุ่นที่ 45 ทุกท่าน ในโอกาสที่เข้ารับพระราชทานปริญญาบัตร ครั้งที่ 43 ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วันพฤหัสบดีที่ 22 มกราคม 2552  
ณ หอประชุมมหาวิทยาลัยเชียงใหม่



## อีกหนึ่งความภาคภูมิใจของคณะแพทยศาสตร์ นักวิจัยดีเด่นและนักวิจัยรุ่นใหม่ดีเด่น ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2551 "รางวัลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่"

คณะแพทยศาสตร์ มข. ขอแสดงความยินดีแก่ ศ.นพ.ธีระ ทองสง  
สังกัดภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา ผู้ได้รับรางวัลนักวิจัยดีเด่น สาขา  
วิทยาศาสตร์สุขภาพ ประจำปี 2551 และ รศ.นพ.สุรพันธ์ คุณอมรพงศ์  
ผู้ได้รับรางวัลนักวิจัย รุ่นใหม่ดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ประจำปี 2551  
ที่เข้ารับ "รางวัลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่" ในงานวันวิชาการมหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ครั้งที่ 4 "วิจัย : นวัตกรรมเพื่อชีวิต" เมื่อวันที่ 19 ธันวาคม 2551 ณ หอประชุม  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### ศาสตราจารย์นายแพทย์ธีระ ทองสง



ศาสตราจารย์ ระดับ 11 สังกัด ภาควิชาสูติศาสตร์  
และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ เริ่ม รับราชการใน  
ตำแหน่ง อาจารย์ เมื่อวันที่ 18 ตุลาคม พ.ศ.2528 ได้รับ  
แต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เมื่อวันที่ 25  
พฤษภาคม พ.ศ.2533 ได้รับแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งรอง  
ศาสตราจารย์ เมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ.2536 ได้รับ  
พระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ ระดับ 10  
เมื่อวันที่ 20 ตุลาคม 2545 ได้รับพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งให้  
ดำรงตำแหน่ง ศาสตราจารย์ ระดับ 11 เมื่อวันที่ 10 ตุลาคม 2548

**ศาสตราจารย์นายแพทย์ธีระ ทองสง** มีความรู้ความชำนาญในสาขา  
สูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โดยเฉพาะในอนุสาขาศรีศาสตร์มารดาและทารก  
(maternal & fetal medicine) ซึ่งอาจารย์ได้ดูแลผู้ป่วยสอนนักศึกษา  
แพทย์ แพทย์ประจำบ้าน แพทย์อนุสาขาศรี และทำงานวิจัยทางด้านนี้อย่างต่อเนื่อง  
มาเป็นเวลามากกว่า 20 ปี มีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารทางการแพทย์จำนวนมาก  
มากกว่า 165 เรื่อง อาจารย์ได้บุกเบิกงานวิจัยด้านคลื่นเสียงความถี่สูงของทารก  
ในครรภ์ ทำให้สามารถวินิจฉัยความพิการโดยกำเนิดของทารกในครรภ์ได้ในระยะ  
เริ่มแรก และได้รับการดูแลที่เหมาะสมตั้งแต่อยู่ในครรภ์ งานวิจัยจำนวนมากได้  
กลายเป็นพื้นฐานของการพัฒนาสาขาวิชานี้ในประเทศไทย คำนึงถึงสุขภาพของมารดา  
ต่าง ๆ ของทารกในครรภ์ได้รับการอ้างอิง และนำไปใช้อย่างกว้างขวางในสถาบัน  
ทางการแพทย์ทั้งในประเทศและต่างประเทศ นอกจากนี้อาจารย์ยังได้บุกเบิกงาน  
วิจัยด้านการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) ของทารกที่เป็นโรค  
โลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โดยคิดค้นยุทธวิธีในการตรวจคัดกรองและการ  
วินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดอย่างมีประสิทธิภาพของโรคนี้ลดลงอย่างมี  
นัยสำคัญในภาคเหนือ ยุทธวิธีในการควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียนี้  
ได้รับการยอมรับและนำไปเป็นต้นแบบของกระทรวงสาธารณสุขในการนำไป  
ประยุกต์ใช้ในระดับประเทศ **ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระ ทองสง** เป็น  
แบบอย่างของอาจารย์และนักวิจัยที่เสียสละ อุทิศตนให้กับการทำงานวิจัย และ  
งานวิชาการมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาทาง  
สาธารณสุขของประเทศไทย และยังมีความมุ่งมั่นที่จะสร้างกลุ่มนักวิจัยรุ่นใหม่  
เพื่อสานต่องานวิจัยให้ยั่งยืน โดยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุน  
สนับสนุนการวิจัย(สกว.)



### รองศาสตราจารย์นายแพทย์ สุรพันธ์ คุณอมรพงศ์

รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 สังกัดภาควิชาพยาธิ  
วิทยา คณะแพทยศาสตร์ เริ่มรับราชการในตำแหน่ง  
อาจารย์ เมื่อวันที่ 30 สิงหาคม พ.ศ.2536 ได้รับแต่งตั้ง  
ให้ดำรง ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ เมื่อวันที่ 5 สิงหาคม  
พ.ศ. 2540 ได้รับแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งรองศาสตราจารย์  
เมื่อวันที่ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2544

**รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุรพันธ์ คุณอมรพงศ์** มีความรู้และความเชี่ยวชาญทางด้านพยาธิวิทยาในโรค โดยเฉพาอย่างยิ่งทางด้านเนื้องอกของรังไข่ ซึ่งได้นำ  
ความรู้มาใช้ในการดูแลผู้ป่วย ในการสอนนักศึกษาแพทย์ แพทย์ฝึกอบรบเฉพาะทาง และแพทย์เฉพาะทางต่อยอด และในการทวิวิจัยทางด้านเนื้องอกของรังไข่เป็นเวลามากกว่า  
10 ปี มีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติกว่า 50 เรื่อง ซึ่งเน้นทั้งงานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งรังไข่ที่กระจายมาจากมะเร็งที่อวัยวะอื่นและมะเร็งปากมดลูก อาจารย์ได้วาง  
แนวทางการทำวิจัยจากงานบริการที่เน้นคุณภาพ และเน้นการติดต่อสื่อสารระหว่างแพทย์และสูติแพทย์ที่จับใจ เพื่อประโยชน์แก่ผู้ป่วย จนได้แนวทางที่สามารถนำไป  
ปฏิบัติได้จริงอย่างเป็นรูปธรรม อันนำไปสู่การจัดตั้งหน่วยพยาธิวิทยาในโรค ซึ่งให้การฝึกอบรมแก่แพทย์เฉพาะทางและแพทย์ประจำบ้าน และทำงานวิจัย  
อย่างมีระบบและมีจริยธรรม จนเป็นที่ยอมรับในวงวิชาการ **รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุรพันธ์ คุณอมรพงศ์** มีความมุ่งมั่นและอุทิศตนในการทำงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง  
เพื่อเผยแพร่ความรู้อันสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และเพื่อสุขภาพที่ดีของคนไทย

## แพทย์ มข. ประสบความสำเร็จคัดตัวอ่อน สำหรับโรคธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และนับเป็นครั้งที่สองของโลก (ต่อจากหน้า 1)

ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
เชียงใหม่ ได้จัดการประชุมวิชาการเชิงปฏิบัติการระดับนานาชาติ "Chiang Mai  
International Workshop on A.R.T." ระหว่างวันที่ 13-16 มกราคม 2552  
ณ ห้องประชุมชั้น 15 อาคารเฉลิมพระบารมี โดยมีวิทยากรผู้เชี่ยวชาญในระดับ  
ชาติและนานาชาติ เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์เกี่ยวกับเทคโนโลยีสมัยใหม่  
ในการทำทารกหลอดแก้วและการคัดตัวอ่อน พร้อมกันนี้ คณะแพทยศาสตร์  
ได้ยังจัดแถลงข่าวความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งเป็น  
ครั้งแรกในประเทศไทย และถือเป็นครั้งที่สองของโลกอีกด้วย โดยมีทีมแพทย์  
ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ร่วมแถลงข่าว



### รศ.นพ. วีระวิทย์ ปิยะมงคล อาจารย์ประจำ

ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์  
มข. กล่าวว่า โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นโรคทาง  
พันธุกรรมชนิดหนึ่งซึ่งพบได้มากที่สุดในโลก โดยเฉพาะ  
เฉพาะในประเทศแถบเอเชีย และถือเป็นปัญหาใหญ่  
ทางสาธารณสุขของประเทศไทย ทารกที่ได้รับ  
การถ่ายทอด ยีนธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจะมี  
อาการซีดอย่างมาและเสียชีวิตในครรภ์ มารดาที่ตั้ง

ครรภ์ทารกดังกล่าวมีความเสี่ยงสูงที่จะประสบภาวะแทรกซ้อนทางสูติศาสตร์  
ร้ายแรงถึงชีวิต ได้แก่ ครรภ์เป็นพิษ ภาวะคลอดยาก และภาวะตกเลือดก่อน  
คลอดและหลังคลอด วิธีในการแก้ไขปัญหาระบาดธาลัสซีเมียที่มีประสิทธิภาพมาก  
ที่สุดในปัจจุบันคือ การตรวจคัดกรองของคู่ที่มีความเสี่ยงที่จะตั้งครรภ์ที่เป็น  
โรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ให้ความรู้และทางเลือกในการวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการ  
เจาะตรวจเลือดหรือการเจาะตรวจเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ และทั้งทั้ง  
ทารกที่เป็นโรคชนิดรุนแรง เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับมารดา

ทั้งนี้การคัดตัวอ่อน (preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการเลือกตัวอ่อน (embryo selection) เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอด

ที่มีความก้าวหน้าสูงสุด เป็นทาง  
เลือกใหม่ที่สามารถช่วยให้มารดา  
ที่มีความเสี่ยง ต่อการมีบุตรเป็น  
โรคทางพันธุกรรมร้ายแรงเริ่ม  
การตั้งครรภ์โดยมั่นใจได้ว่าทารก  
ปราศจากโรคดังกล่าว ช่วยให้  
มารดาไม่ต้องทำแท้งดังเช่น ใน  
กรณีที่เกิดการวินิจฉัยก่อนคลอด  
พบว่าทารกมีความผิดปกติ



การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวในกระหา  
โดยการตัดเซลล์ 1-2 เซลล์จากตัวอ่อนระยะวันี่สามหลังการปฏิสนธิในหลอด  
แก้วซึ่งมี 8-10 เซลล์ แล้วใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ทางอนุชีววิทยาเพาะบนานาใน  
การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโรคพันธุกรรมธาลัสซีเมียจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว  
การคัดตัวอ่อนนี้จึงเป็นโครงการที่มีความละเอียดอ่อนและซับซ้อนสูง จำเป็นต้อง  
อาศัยความร่วมมือของผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหลายสาขาวิชา ได้แก่ นรีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ  
เฉพาะในการดูแลทารกหลอดแก้ว นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะใน  
การดูแลตัวอ่อน นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการตรวจวิเคราะห์  
ดีเอ็นเอจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว และสูติแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการ  
ดูแลมารดาและทารกในครรภ์ (อ่านต่อหน้า 6)









### มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แลงข่าว “หมอกควันเชียงใหม่ กัดไถ่ตัว”

ศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ศักดิ์ อังคสิทธิ์ อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นประธานเปิดการแถลงข่าว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เรื่อง “หมอกควันเชียงใหม่ กัดไถ่ตัว” เพื่อเผยแพร่ความรู้ ข่าวสาร และปรึกษาหารือด้านปัญหา แนวทางการแก้ไข ในสถานการณ์หมอกควันของจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีคณะผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิชาการ นักวิจัย บุคลากร ตลอดจน สื่อมวลชนทุกแขนง เข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนข้อคิดเห็น ณ ห้องประชุมพระยาศรีสุริยราชานุสรณ์ สำนักงานมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2552 ■

### แพทย์มช. ประสบความสำเร็จ คัดตัวอ่อนอัลฟาธาลัสซีเมีย ครั้งแรกของประเทศไทย

ทีมแพทย์จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประสบความสำเร็จ ในการคัดตัวอ่อนทารกโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกของประเทศไทยและเป็น ครั้งที่สองของโลก ช่วยในมารดาที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงสามารถตั้งท้องได้อย่างมั่นใจว่าลูกจะปราศจากโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย

รศ.ดร.นพ.วิโรจน์ นิชะมงคล ภาควิชาสูติศาสตร์



และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ กล่าวว่า “โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวที่พบได้มากที่สุดในโลก มีความชุกสูงในประชากรแถบเอเชีย และเป็นปัญหาใหญ่ทางสาธารณสุขปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ทารกที่ได้รับการถ่ายทอดยีนธาลัสซีเมีย

ชนิดรุนแรงจะมีอาการซีดอย่างมากและเสียชีวิตในครรภ์ มารดาที่ตั้งครรภ์หากดังกล่าวยังมีความเสี่ยงสูงที่จะประสบภาวะแทรกซ้อนทางสูติศาสตร์ร้ายแรงถึงชีวิต ได้แก่ ครรภ์เป็นพิษ ภาวะคลอดยาก และภาวะตกเลือดก่อนคลอดและหลังคลอด ผู้ป่วยที่ได้รับการถ่ายทอดโรคปิตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจากบิดาและมารดาจะมีอาการซีดมาก จำเป็นต้องได้รับเลือดอย่างต่อเนื่อง มีภูมิคุ้มกันต่ำและประสบภาวะแทรกซ้อนร้ายแรงจากการให้เลือด ได้แก่ โรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบและโรคเอดส์ ภาวะธาตุเหล็กคั่งในร่างกาย โรคเบาหวาน การรักษาโรคปิตาธาลัสซีเมียให้หายขาดโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูกยังเป็นวิธีที่ยังยาก มีความเสี่ยงสูง และมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

กลวิธีในการแก้ไขปัญหาระบาดของโรคธาลัสซีเมียที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบันคือการควบคุมจำนวนผู้ป่วยใหม่โดยการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงที่จะตั้งครรภ์บุตรที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ให้ความรู้และทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการเจาะตรวจเลือดหรือการเจาะตรวจเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ และทำแท้งทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงหากคู่สมรสต้องการครอบครัวที่มีสุขภาพแข็งแรง ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยปิตาธาลัสซีเมียจนถึงอายุ 30 ปีมีมูลค่าสูงถึง 6 ล้านบาทต่อคน จากจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่เกิดขึ้นปีละประมาณ 4,000 คน คิดเป็นภาระค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น 24,000 ล้านบาททุกปี จากภาวะผู้ป่วยเดิมที่มีอยู่แล้ว 523,750 คน และมีทารกโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงรายใหม่เกิดขึ้น สร้างความเสี่ยงต่อการเกิดอันตรายร้ายแรงจนถึงแก่ชีวิตของมารดาถึงปีละ 1,250 ราย (อ่านต่อหน้า 2)



ข่าวรอบสัปดาห์

<http://pr.oop.cmu.ac.th>

**มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**  
CHIANG MAI UNIVERSITY WEEKLY NEWS

ฉบับที่ 9 ปีที่ 4

วันที่ 23 กุมภาพันธ์ - 1 มีนาคม 2552

### รางวัลสหกิจศึกษาแห่งชาติ ประจำปี 2551 จากสำนักงานคณะกรรมการสหกิจศึกษาแห่งชาติ



ศ.พญ.วิรัตน์ ศิริธนะ



ดร.วรรณวิทย์ ไชยสาร



อ.ดร.ชัยวิชิต ดวงสงค์



ดร.พีรพรณ โปธำเจริญ

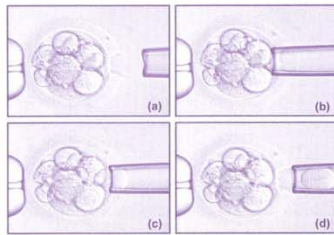


ดร.ศรศักดิ์ เทียนหวาน

นักวิจัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับรางวัลสหกิจศึกษาแห่งชาติ ประจำปี 2551 ประเภทวิทยานิพนธ์ 4 รางวัล และรางวัลผลงานวิจัย 1 รางวัล จาก พณฯ ท่านนายกรัฐมนตรีอภิสิทธิ์ เวชชาชีวะ ซึ่งจัดโดยสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ในงาน “วันนักประดิษฐ์” และ “วันนักประดิษฐ์นานาชาติ ครั้งที่ 2” เมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2552 ณ อิมแพค เมืองทองธานี ผู้ได้รับรางวัลสหกิจศึกษาแห่งชาติ ประจำปี 2551 ได้แก่ ศ.พญ.วิรัตน์ ศิริธนะ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ดร.วรรณวิทย์ ไชยสาร ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ อ.ดร.ชัยวิชิต ดวงสงค์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ดร.พีรพรณ โปธำเจริญ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ดร.ศรศักดิ์ เทียนหวาน ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ (อ่านต่อหน้า 2)



### คัดตัวอ่อนอัลฟาธาลัสซีเมีย (ต่อจากหน้า 1)



รูปที่ 1 เทคนิคการคัดตัวอ่อนอัลฟาธาลัสซีเมีย (ต่อจากหน้า 1) หลังจากการปฏิสนธิ (a) จับตัวอ่อนไว้ให้แน่นโดย holding pipette ด้านซ้าย จะเจาะเปลือก zona pellucida ด้วยเลเซอร์ (b), (c) และ (d) เซลล์เดี่ยวถูกดูดออกมาด้วยความระมัดระวังโดยใช้ biopsy pipette ผ่านทางช่องของเปลือก zona pellucida ที่เปิดเอาไว้ หลอดการนำโดย รศ.นพ.ธีระพร ภูมยอนันท์

**รศ.ดร.นพ.วิโรจน์** หัวหน้าโครงการวิจัยฯ ได้อธิบายถึงกระบวนการคัดตัวอ่อน ว่า “การคัดตัวอ่อน” หรือการวินิจฉัยระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดที่สามารถกระทำได้เร็วที่สุด เป็นทางเลือกใหม่สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรง มาตราที่มีความเสี่ยงดังกล่าวสามารถเริ่มต้นการตั้งครรภ์ได้ทันทีได้ด้วยการปลอดจากโรคทางพันธุกรรมที่ครอบครัวเป็นพาหะ การคัดตัวอ่อนช่วยให้ครอบครัวสามารถหลีกเลี่ยงการทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการวินิจฉัยก่อนคลอดพบว่าทารกมีความผิดปกติ มารดาจึงไม่ต้องเสี่ยงต่อการแท้งบุตรหรือภาวะแทรกซ้อนอื่นเนื่องมาจากการคัดการในการวินิจฉัยก่อนคลอด การคัดตัวอ่อนจึงเป็นวิธีลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่ใช่ดื้อต่อยารักษา ติลธรรม และกฎหมาย

เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ การคัดตัวอ่อนจำเป็นต้องใช้เทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว เทคนิคการเก็บตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ โดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่ 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว แล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก ข้อดีของเทคนิคนี้คือ การคัดตัว 1-2 เซลล์ดังกล่าวไม่มีผลเสียต่อพัฒนาการของตัวอ่อนอย่างใดที่ทราบ ซึ่งจำต้องของเทคนิคนี้คือ จำนวนเซลล์ที่ได้เพียง 1-2 เซลล์เพื่อใช้ในการวินิจฉัย และระยะเวลาในการวินิจฉัยที่มีเพียง 24 ชั่วโมง เนื่องจากศูนย์การทำการหลอดแก้วส่วนใหญ่ต้องการที่จะใส่ตัวอ่อนเข้าไปในโพรงมดลูก

ในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ ทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคดังกล่าวให้มีความรวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง

มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคพันธุกรรมต่างๆ โดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ทางอณูชีววิทยา สำหรับโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยว เช่น ธาลัสซีเมีย ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยว การคัดตัวอ่อนเป็นโครงการที่มีความละเอียดอ่อนและซับซ้อนสูง จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือของผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหลายสาขาวิชา ได้แก่ เวชแพทยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลการทำการหลอดแก้ว นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลตัวอ่อนมนุษย์ นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว และผู้ดูแลแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในการดูแลมารดาและทารกในครรภ์

การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) ยังเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อนและซับซ้อน มีขั้นตอนแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของโรคและลักษณะความผิดปกติของยีน ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียมการตรวจแต่ละราย เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ ปัญหาสำคัญในการคัดตัวอ่อนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่จากเซลล์เดี่ยวได้แก่ ปัญหาประสิทธิภาพของการขยายปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ ปัญหาการตรวจยีนได้ไม่ครบ และปัญหาการปนเปื้อน ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาใหม่ไม่ผลการวินิจฉัยหรือการวินิจฉัยผิดพลาดได้

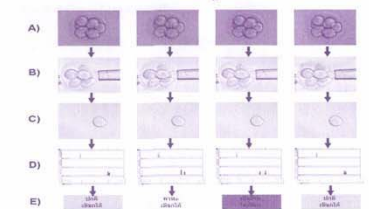
โครงการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมีย มี **รศ.ดร.นพ.วิโรจน์** ปิยะมงคล และ **รศ.นพ.ธีระพร ภูมยอนันท์** เป็นหัวหน้าโครงการฯ ได้เริ่มให้บริการการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดี่ยว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 2 พ.ค.2547 โดยได้รับการสนับสนุนจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สาขาวิชารังสีวิทยา (วช.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) บริษัท เอลิ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด และบริษัท เซอร์วิซ-ฟลาว ออร์แกน จำกัด

โครงการฯ ให้บริการทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือกตัวอ่อนก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มีผิดปกติของยีนธาลัสซีเมีย และ ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นครั้งที่สองของโลก ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูล

เมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2551 น้ำหนักแรกคลอด 3,280 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือกตัวอ่อนก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ผลความสำเร็จดังกล่าวได้รับการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติหลายแห่ง ได้รับความสนใจจากสื่อมวลชนทุกแขนง นับเป็นโอกาสอันดีในการประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนตื่นตัวรู้จักโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย

**รศ.ดร.นพ.วิโรจน์** กล่าวสรุปในตอนท้ายว่า การคัดตัวอ่อนหรือการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครรภ์โดยมีทารกที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เป็นการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำทั้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมีผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่า สามารถทำการตรวจได้ทั้งความผิดปกติทางโครโมโซมและความผิดปกติทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยว การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในการตรวจโรคทางพันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่มีความจำเป็นในแต่ละความผิดปกติ ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการพัฒนาอย่างมาก สถานการณ์ในประเทศไทย การคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียและธาลัสซีเมียประสมความสาหัสเป็นครั้งแรก ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ จังหวัดเชียงใหม่

ความสำเร็จครั้งนี้เป็นการเผยแพร่ชื่อเสียงของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับวิสัยทัศน์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ในการเป็นมหาวิทยาลัยชั้นนำที่มุ่งเน้นการวิจัย พร้อมทั้งส่งเสริมให้คณะแพทยศาสตร์ มช. เป็นสถาบันทางการแพทย์ระดับมาตรฐานสากล



รูปที่ 2 การวินิจฉัยก่อนการฝังตัว (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) หรือการคัดตัวอ่อน (Embryo selection) สำหรับโรคธาลัสซีเมีย (A) ตัวอ่อนจากการทำทารกหลอดแก้วระยะวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (B) การดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนโดยเครื่องมือ micromanipulator (C) เซลล์เดี่ยวที่ได้จากตัวอ่อนแต่ละตัวเพื่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (D) ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) (E) เลือกตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคเพื่อใส่ในโพรงมดลูกของมารดาในวันที่ 4 หลังการปฏิสนธิ การทำการหลอดแก้วและการดูดเซลล์ตรวจจากตัวอ่อนทำโดย รศ.นพ.ธีระพร ภูมยอนันท์ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย รศ.ดร.นพ.วิโรจน์ ปิยะมงคล

### รางวัลสภากวียแห่งชาติ ประจำปี 2551

(ต่อจากหน้า 1)

**ศ.พญ.วิรัตน์ สิริสุนทร** ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ได้รับรางวัลผลงานวิจัยชมเชย เรื่อง “ผลการรักษาผู้ป่วยเด็กด้วยยาต้านไวรัสเอชไอวีในโครงการ ‘เข้าถึงยาเอชไอวี’ ของประเทศไทย : ผลงานวิจัยจากภาระงานประจำ”

**ดร.วรรณวิทย์ ไชยสาร** ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ดีเยี่ยม ประจำปี 2551 สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพและคณิตศาสตร์ จากวิทยานิพนธ์เรื่อง “การเตรียมและการหาลักษณะเฉพาะของเซรามิกนาโนคอมโพสิตในระบบ บีทีและระบบไทเทเนียมออกไซด์-ไทเทเนียมออกไซด์” (Preparation and Characterization of Ceramic Nanocomposites in the PZT-BT and TiO<sub>2</sub>-SnO<sub>2</sub> Systems) โดยมี **รศ.ดร.สุเทพ อนันดา** เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

**อ.ดร.ขวัญจิต ดวงสงฆ์** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ชมเชย ประจำปี 2551 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากวิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาและวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*” โดยมี **Dr. Craig Winstanley** เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

**ดร.พีรพรรณ ปิลาเจริญ** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ชมเชย ประจำปี 2551 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากวิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาส่วนประกอบของสายคนดรอยด์ 6-ซัลเฟตที่หาปฏิกิริยาจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WF6” (Investigation of the Epitope in Chondroitin 6-Sulfate Chains Recognized by Monoclonal Antibody WF6) โดยมี **รศ.ดร.ปรีชา คุนวิเลิศ** เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

**ดร.ศรัทธี เตียนหวาน** ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ชมเชย ประจำปี 2551 สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพและคณิตศาสตร์ จาก

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การหาข้อจำกัดสำหรับฟังก์ชันไม่ขยายและการส่งฟังก์ชันไม่ขยายแบบเชิงเส้นกับในปริภูมิบานาค” (Fixed Point Iterations for Nonexpansive and Asymptotically Nonexpansive Mappings in a Banach Space) โดยมี **ศ.ดร.สุเทพ สอนดี** เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รางวัลสภากวียแห่งชาติ เป็นรางวัลที่ส่งเสริมและสนับสนุนและสร้างแรงจูงใจให้มีการทำวิจัยอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งมีการพัฒนางานวิจัยให้มีคุณภาพเทียบเท่ามาตรฐานชาติ โดยสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) จะมีการมอบรางวัลยกย่องเชิดชูเกียรติของนักวิจัยและนักประดิษฐ์คิดค้นไทยทั้งด้านวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์เป็นประจำทุกปี

ทั้งนี้ นับเป็นความภาคภูมิใจของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่นักวิจัย มช.ได้รับรางวัลจากสภากวียแห่งชาติ(วช.) ทั้งประเภทรางวัล ผลงานวิจัยชมเชย รางวัลวิทยานิพนธ์ดีเยี่ยม และรางวัลวิทยานิพนธ์ชมเชย ประจำปี 2551 นี้ ■