

บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบบรรยาย

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พวบ เมาธิวิจัยอาวุโส สกว.
ครั้งที่ 8

วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551

โรงแรมฮอติเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



Preimplantation Genetic Diagnosis of alpha-ThalassemiaPiyamongkol, W.^{1*}, Vutyavanich, T.¹, Sanguansermisri, T.²¹*Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*²*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^{-SEA} for couples at risk. Novel set of primers was developed and tested as gap PCR for identifying alpha-thalassemia^{-SEA} 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^{-SEA} 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 บางคนจึงเรียกรวีนี

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) และการเลี้ยงตัวอ่อนในตู้บ่อต่อไปจนถึงระยะ 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 ที่ต้องการตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ได้ 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 จากมารดาที่เป็นพันธุทางในเซลล์ที่เป็นโรคพันธุ์แท้ จะทำให้การวินิจฉัยสรุปว่าตัวอ่อน นั้นเป็นพันธุทาง (แฝง) และเลือกตัวอ่อนที่เป็นโรคดังกล่าวใส่ในโพรงมดลูก การตรวจวิเคราะห์ โดยใช้ DNA fingerprinting ร่วมด้วย จะช่วยบอกได้ว่ามี DNA ปนเปื้อนหรือไม่ และ ป้องกันการวินิจฉัยผิดพลาดได้ (Piyamongkol *et al.*, 2001b)

บทสรุป

โดยสรุป การตรวจ PGD หรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครคร์ โดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมีข้อผิดปกติ 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)

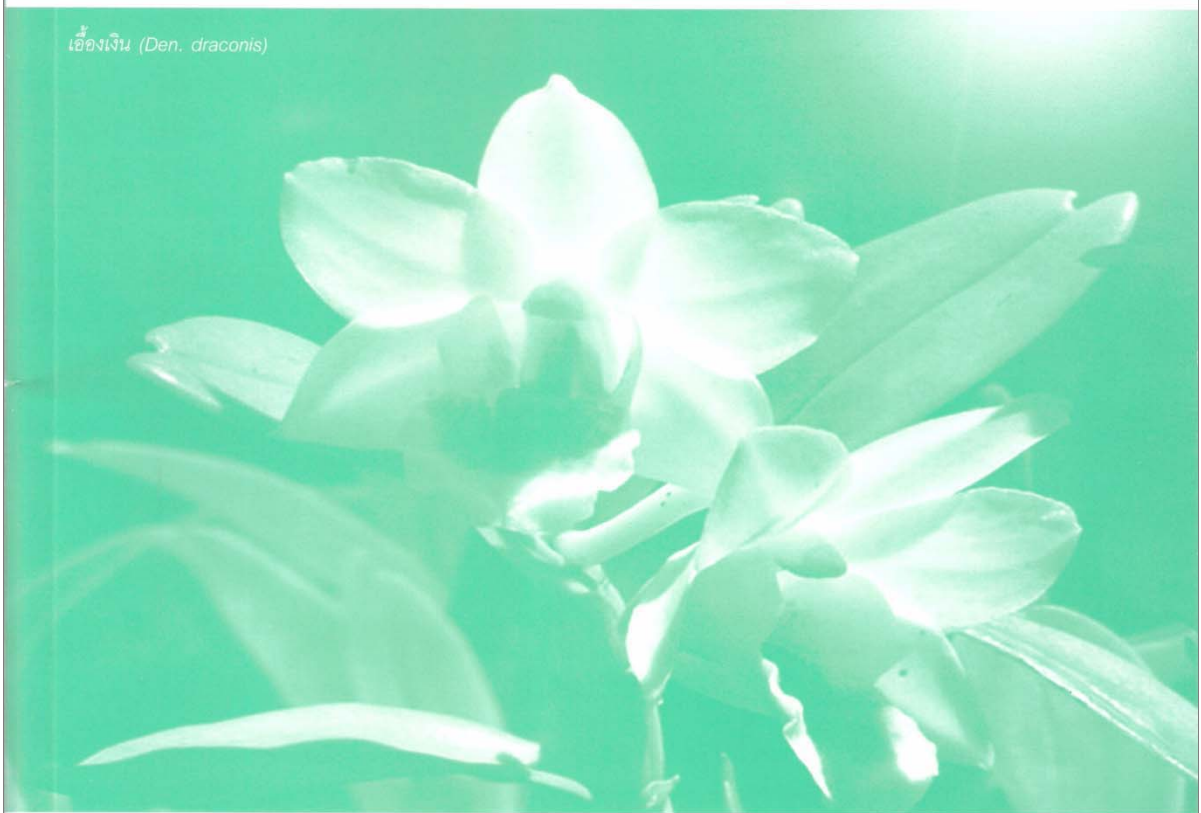
ร่วมกับ

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 translocation¹² และโรคพันธุกรรมยีนเดี่ยว^{3,44} การวินิจฉัยก่อนการฝังตัวนี้เป็นประโยชน์กับครอบครัวหรือกลุ่มศาสนาที่ต้องการมีบุตรที่ปราศจากโรคพันธุกรรมแต่ไม่ต้องการการทำแท้งบุตร 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^{5,66} นอกจากนี้ คู่สมรสที่มีบุตรยากหรือประสบปัญหาแท้งบุตรซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยมีสาเหตุเนื่องมาจากมีความผิดปกติของโครโมโซมชนิด translocation ผังอยู่ สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนปกติเพื่อใส่ในโพรงมดลูก และตั้งครรภ์โดยมีทารกปกติได้

การตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Alan Handyside ชาวอังกฤษเป็นผู้ตัดเซลล์ blastomere จากตัวอ่อนระยะ cleavage ซึ่งมี 8-10 เซลล์ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจวินิจฉัยเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซมเพศโดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ที่โรงพยาบาล Hammersmith กรุงลอนดอน⁷ ต่อมาก็ได้มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสสมัยใหม่ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridisation (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นจำนวนนับและที่เป็น translocation และใช้ในการตรวจเพศของตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดบนโครโมโซมเพศ (ส่วนใหญ่เป็น X-linked recessive) ส่วนโรคพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR)⁸

Cleavage stage embryo biopsy

เพื่อให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยและคัดเลือกตัวอ่อนที่ปกติ การทำ PGD จำเป็นต้องใช้เทคนิคการทำทารกหลอดแก้ว (in vitro fertilisation, IVF) เทคนิคการเก็บตัวอย่างจากตัวอ่อนที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในโลกคือ การตัดตรวจเซลล์ระยะ 8-10 เซลล์ ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิ (cleavage stage embryo biopsy)⁹ กระทำโดยการเจาะรูที่ zona pellucida ของตัวอ่อนระยะที่มี 8-10 เซลล์ที่เจริญมาจากการทำทารกหลอดแก้ว โดยใช้สารละลาย acid Tyrodes หรือลำแสงเลเซอร์ หรือใช้เข็มของปลาย pipette ตัดแล้วดูดเอา 1-2 เซลล์ออกมาโดยใช้เครื่องมือ micromanipulator แล้วนำ 1-2 เซลล์ดังกล่าวไปทำการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม¹⁰ ผลการตรวจนี้ช่วยให้สามารถเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวใส่เข้าไปในโพรงมดลูก

Polar body biopsy

เทคนิคอื่นที่มีผู้ใช้ในการเก็บตัวอย่างในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ การตัดตรวจ polar body^{11;12} 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 blastocyst¹³ 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 ในการตรวจเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมเพศ¹⁰ แต่ต่อมาพบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเพศตัวอ่อนอาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้¹⁴ 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) เพื่อเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์และหลีกเลี่ยงการตั้งครรภ์ทารกที่มีความผิดปกติของโครโมโซม¹⁵ 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 2-20¹⁶ 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 จะช่วยลดความเสี่ยงที่จะวินิจฉัยผิดพลาดได้¹⁷

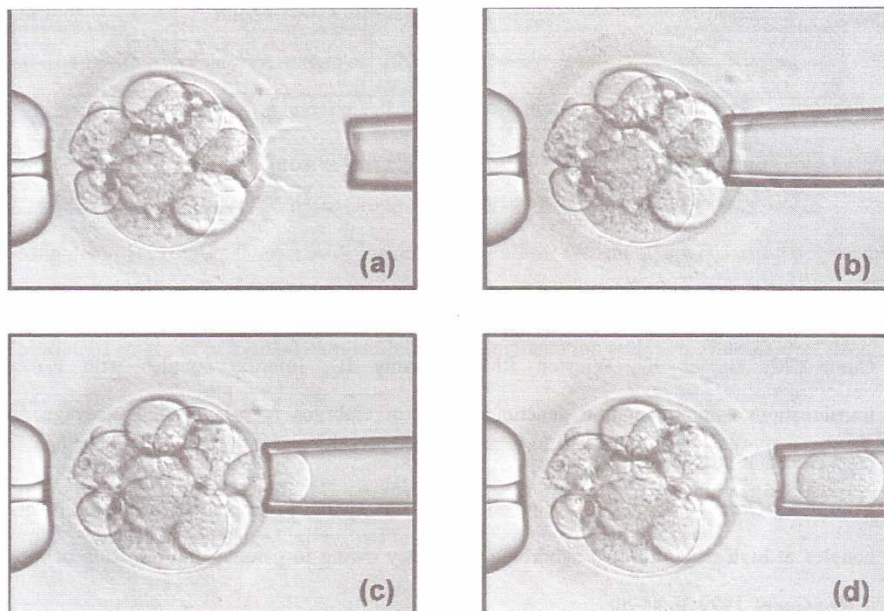
ปัญหาการปนเปื้อนเป็นปัญหาใหญ่อีกปัญหาหนึ่งในการทำปฏิกิริยาถูกโซ่จากเซลล์เดียว สามารถป้องกันการปนเปื้อน DNA จากสิ่งแวดล้อมได้โดยการเตรียมการทำปฏิกิริยาถูกโซ่ในห้องแยกพิเศษที่สะอาด และอยู่ต่างที่กับบริเวณที่ทำการตรวจวิเคราะห์ สารเคมีและน้ำยาเลี้ยงเซลล์ควรได้รับการตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนอยู่เสมอ 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 แปลกปลอมก่อนที่จะใส่เซลล์ที่ต้องการตรวจวินิจฉัย¹⁸ 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 และป้องกันการวินิจฉัยผิดพลาดได้³

บทสรุป

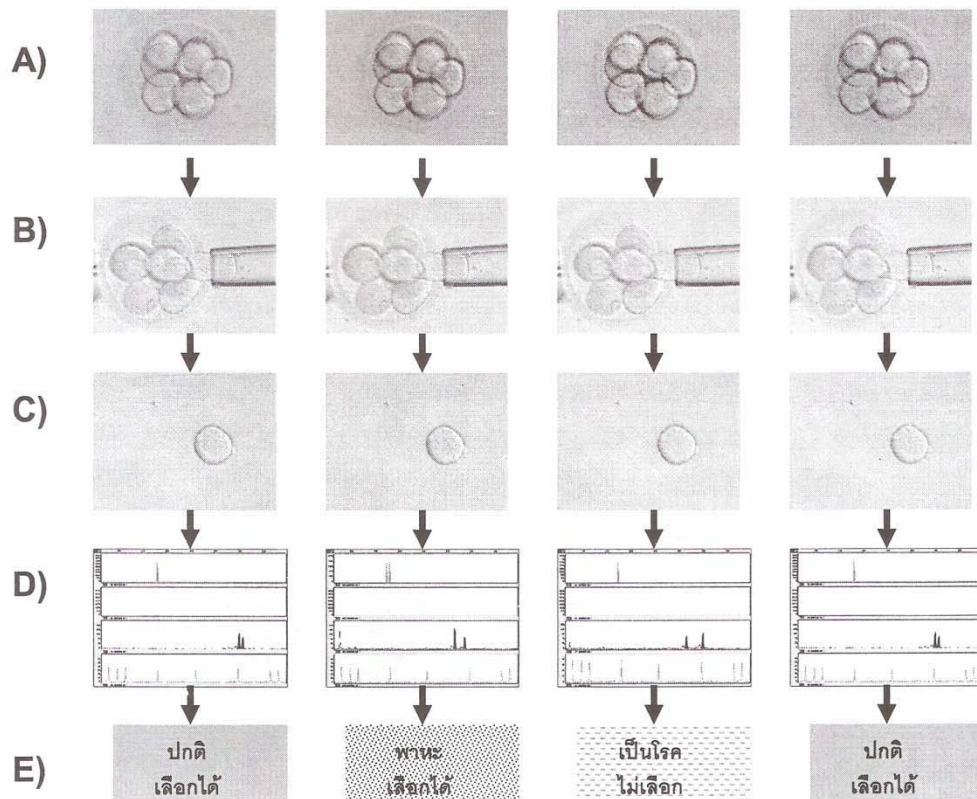
โดยสรุป การทำ PGD หรือการเลือกตัวอ่อนเป็นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เป็นทางเลือกใหม่ให้ครอบครัวที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงได้ตั้งครรถ์โดยมีตัวอ่อนที่ปราศจากโรคดังกล่าว ได้เปรียบการวินิจฉัยก่อนคลอดแบบเดิมที่ไม่จำเป็นต้องทำแท้งบุตรในกรณีที่ผลการตรวจพบว่าทารกมีข้อผิดปกติ จึงเป็นที่ยอมรับของสังคมมากกว่าและไม่ผิดจริยธรรม ศีลธรรม และกฎหมาย

สถานการณ์ในประเทศไทย โดยการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สภากิจ (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.), บริษัท เอไซ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด และบริษัท เซริง ฟลาว ออร์แกนอน (ประเทศไทย) จำกัด หัวหน้าโครงการฯ รศ.ดร.นพ.วิรัช พิชะมงคล และรศ.นพ.ธีระพร วุฒยวนิช ได้ริเริ่มให้บริการการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมีย โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว ณ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 ทำการตรวจไปแล้ว 3 ราย ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนโรคธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ทารกเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2548 น้ำหนักแรกคลอด 2,900 กรัม สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ผลการตรวจเลือดทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดยืนยันผลการตรวจก่อนการฝังตัวว่าทารกไม่มียีนผิดปกติของโรคธาลัสซีเมีย¹⁹ ประสบความสำเร็จในการคัดตัวอ่อนสำหรับโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นครั้งที่สองของโลก ได้ทารกเพศชายคลอดเมื่อวันที่ 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.

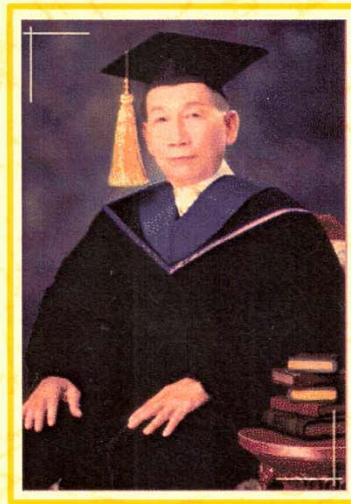


การประชุมวิชาการ

ศ.เกียรติคุณ ดร.นพ.ปัญญา กุลพongษ์



**ความก้าวหน้าในการตรวจทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา
2552**



จัดโดย คณะจารย์แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

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 ชาวอังกฤษเป็นผู้ค้นพบ blastomere จากตัวอ่อนระยะ cleavage ซึ่งมี 8-10 เซลล์ในวันที่ 3 หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจวินิจฉัยเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซมเพศโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ที่โรงพยาบาล Hammersmith กรุงลอนดอน (Handyside *et al.*, 1990) ต่อมาก็ได้มีสถาบันทางการแพทย์หลายสถาบันทั่วโลกประยุกต์ใช้และให้บริการการวินิจฉัยก่อนการฝังตัวสำหรับโรคพันธุกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสมัยใหม่ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridisation (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นจำนวนนับและที่เป็น translocation และใช้ในการตรวจเพศของตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคที่ถ่ายทอดบนโครโมโซมเพศ (ส่วนใหญ่เป็น X-linked recessive) ส่วนโรคพันธุกรรมชนิดอื่นเดี่ยวใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (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 นอกจากนี้ เทคนิคการตรวจนี้ยังไม่สามารถทำนายความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นหลังการปฏิสนธิได้ 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 ในการตรวจเพศตัวอ่อนเพื่อหลีกเลี่ยงโรคพันธุกรรมที่เกี่ยวกับโครโมโซมเพศ (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