

**Thesis Title** Molecular Characterization of  $\beta$ -thalassemia Intermedia and  $\beta$ -thalassemia Major in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital

**Author** Miss Waratip Sritong

**M.S.** Medical Technology

**Examining Committee**

Lecturer Dr. Thanusak Tatu	Chairman
Emeritus Professor Dr. Torpong Sanguanserm Sri	Member
Emeritus Professor Dr. Panja Kulapongs	Member
Associate Professor Dr. Supan Fucharoen	Member

**ABSTRACT**

$\beta$ -thalassemia encompasses a broad clinical spectrum ranging from a mild form of  $\beta$ -thalassemia intermedia to a severe type of  $\beta$ -thalassemia major. At least three genetic modifying factors alleviating the clinical severity in the  $\beta$ -thalassemia syndrome were revealed including the mild  $\beta$ -thalassemia mutations, co-existence of  $\alpha$ -thalassemia and the presence of the  $XmnI$ - $\gamma$  site which results in increased synthesis of fetal hemoglobin. However, geographical and ethnic heterogeneity of the pattern of association of these three genetic modifying factors and clinical picture in  $\beta$ -thalassemia has been collectively observed. The pattern of association of these three genetic modifiers with the clinical presentation among the patients with  $\beta$ -thalassemia in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital has never been reported. The objectives of this study were to characterize the molecular background of  $\beta$ -thalassemia intermedia and  $\beta$ -thalassemia major and to determine the associations of these three genetic factors with the clinical presentations of the  $\beta$ -thalassemia in Maharaj Nakorn Chiang Mai

Hospital. The study was performed in 60  $\beta$ -thalassemic patients, 32 of whom were clinically categorized as  $\beta$ -thalassemia major and 28 as  $\beta$ -thalassemia intermedia. Hb levels, Hb identification, F cell enumeration as well as detections of  $\beta$ -thalassemia mutations,  $\alpha$ -thalassemia deletion (SEA type) and  $Xmnl$ - $\gamma$  polymorphism were conducted in all subjects. Automated nucleotide sequencing was undertaken to confirm the  $\beta$ -thalassemia mutations characterized by the mutagenically separated polymerase chain reaction (MS-PCR). It was found that the types of  $\beta$ -thalassemia mutations identified by both the MS-PCR and the nucleotide sequencing completely matched. Eight  $\beta$ -thalassemia mutations producing both  $\beta^0$ - and  $\beta^+$ -thalassemia were found with the  $\beta^0$ -thalassemia producing alleles accounting for 61.66% in which the 4bp (-TTCT) deletion predominated,  $\beta^+$ -producing alleles for 7.43% and  $\beta^E$ -allele for 25%. The  $Xmnl$ - $\gamma$  allele ( $Xmnl$ - $\gamma$ , +) was less frequently detected than the absent one ( $Xmnl$ - $\gamma$ , -) (29.1% & 70.9%, respectively). The  $\alpha$ -thalassemia (SEA type) was the least frequent genetic modulating factor observed (15.6%). No consistent associations of these three analyzed genetic factors with the clinical presentation were demonstrated. It was concluded that the genetic background of the  $\beta$ -thalassemia major and the  $\beta$ -thalassemia intermedia in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital was heterogeneous. The  $\beta$ -thalassemia mutations and the  $Xmnl$ - $\gamma$  polymorphism seems to be the best prediction markers for clinical severity of this disorder. Moreover, the  $Xmnl$ - $\gamma$  polymorphism is closely linked to the  $\beta^E$ -gene and in combination with the HbE/ $\beta^0$ -thalassemia most likely resulted in  $\beta$ -thalassemia intermedia. However, other genetic and non-genetic modifying factors particularly those associated with augmentation of HbF production remain to be further elucidated.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การวิเคราะห์ลักษณะทางโมเลกุลในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิดที่มีอาการทางคลินิกปานกลางและรุนแรงในโรงพยาบาลมหาราชานครเชียงใหม่

**ชื่อผู้เขียน** นางสาววราทิพย์ ศรีทอง

**วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต** สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

อาจารย์ ดร.ธนศักดิ์ ตาตุ	ประธานกรรมการ
ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี	กรรมการ
ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ปัญญา กุลพงษ์	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ พูเจริญ	กรรมการ

**บทคัดย่อ**

$\beta$ -thalassemia มีอาการของโรคแตกต่างกันได้มากตั้งแต่ชนิดที่มีอาการรุนแรงปานกลาง ( $\beta$ -thalassemia intermedia) และชนิดที่มีอาการรุนแรงมาก ( $\beta$ -thalassemia major) โดยมีปัจจัยที่ช่วยลดความรุนแรงของโรค ได้แก่ ชนิดของบีตาธาลัสซีเมียมิวเตชัน การมีอัลฟาธาลัสซีเมียร่วม และการมี  $XmnI$ - $\gamma$  site ซึ่งเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเพิ่มการสังเคราะห์ HbF อย่างไรก็ตามการแสดงออกของปัจจัยทั้ง 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันไปขึ้นกับพื้นที่และเชื้อชาติของผู้ป่วย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามดังกล่าวในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลมหาราชานครเชียงใหม่ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาพื้นฐานระดับโมเลกุลของผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia intermedia และ  $\beta$ -thalassemia major และเพื่อศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ของปัจจัยทางโมเลกุลทั้งสามชนิดดังกล่าวกับอาการทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย จำนวน 60 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ  $\beta$ -thalassemia major จำนวน 32 คน และ  $\beta$ -thalassemia intermedia จำนวน 28 คน การศึกษาประกอบด้วย การตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb levels), การตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC), การตรวจหา F cells ด้วยวิธี immunofluorescence staining, การตรวจหา  $\beta$ -thalassemia mutations, การตรวจ  $\alpha$ -thalassemia gene ชนิด Southeast Asian (SEA) type และ

การตรวจหา  $XmnI$ - $\gamma$  polymorphism และใช้วิธี direct nucleotide sequencing ในการยืนยันผลการตรวจ  $\beta$ -thalassemia mutations โดยวิธี mutagenically separated polymerase chain reaction (MS-PCR) จากการศึกษพบว่าผลการตรวจ  $\beta$ -thalassemia mutations จากทั้งสองวิธีให้ผลตรงกันและพบ  $\beta$ -thalassemia mutations ทั้งหมด 8 ชนิดซึ่งทำให้เกิดทั้ง  $\beta^0$  และ  $\beta^+$ -thalassemia โดยพบ mutations ที่ทำให้เกิด  $\beta^0$ -thalassemia ร้อยละ 61.66 ซึ่งมี  $\beta^0$ -thalassemia mutation ชนิด 4-bp (-TTCT) deletion มากที่สุด พบ  $\beta$ -thalassemia mutations ที่ทำให้เกิด  $\beta^+$ -thalassemia ร้อยละ 7.43 และพบ  $\beta^E$  ร้อยละ 25 นอกจากนี้พบผู้ป่วยที่มี  $XmnI$ - $\gamma$  allele ( $XmnI$ - $\gamma$ : +) น้อยกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี  $XmnI$ - $\gamma$  allele ( $XmnI$ - $\gamma$ : -) โดยพบร้อยละ 29.1 และ 70.9 ตามลำดับ และพบพาหะของ  $\alpha$ -thalassemia ชนิด SEA น้อยที่สุดคือร้อยละ 15.6 ความสัมพันธ์ของปัจจัยระดับโมเลกุลทั้งสามกับอาการทางคลินิกในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia ที่ศึกษาไม่มีความแน่นอน จากการศึกษาสรุปว่าลักษณะทางโมเลกุลของ  $\beta$ -thalassemia major และ  $\beta$ -thalassemia intermedia ของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่มีความหลากหลาย ชนิดของ  $\beta$ -thalassemia mutations และ  $XmnI$ - $\gamma$  polymorphism น่าจะนำมาใช้ในการทำนายอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคนี้ ยิ่งไปกว่านั้น  $XmnI$ - $\gamma$  polymorphism มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ  $\beta^E$ -gene และถ้าพบร่วมกับ HbE/ $\beta^0$ -thalassemia ส่วนมากผู้ป่วยจะมีอาการทางทางคลินิกเป็น  $\beta$ -thalassemia intermedia อย่างไรก็ตาม ยังจะต้องทำการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ HbF เพิ่มเติมอีกต่อไป