

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุมารดา มารดาและโพลีมอร์ฟิซึมในยีน 5,10-เมทิลีน เตตราไฮโดรโฟเลท  
รีดักเตสของมารดาเป็นปัจจัยเสี่ยงของไตรโซมี 21



นางสาวรัชชวัญ อินทบัณฑิต

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชากุมารเวชศาสตร์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6849-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MATERNAL AGE AND A POLYMORPHISM IN A MATERNAL 5,10-METHYLENE  
TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE AS RISK FACTORS OF TRISOMY21



Miss Tachakwan Intapuntee

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pediatrics

Department of Pediatrics

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6849-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์      ความสัมพันธ์ระหว่างอายุมารดาและโพลิมอร์ฟิซึมในยีน 5,10-  
เมทิลีน เตตราไฮโดรโฟเลต รัศมีของมารดาเป็นปัจจัยเสี่ยงของ  
ไตรโซมี 21

โดย                              นางสาวชัชวัญ อินทป็นดี

สาขาวิชา                      กุมารเวชศาสตร์

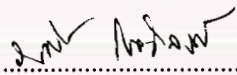
อาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

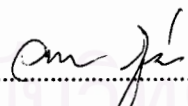
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์สุทธิพงษ์ วีชรสินธุ์)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วรพงษ์ กุ่มพงส์)

สภามหาวิทยาลัย  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รัชชวัญ อินทป็นตี : ความสัมพันธ์ระหว่างอายุมารดาและโพลิมอร์ฟิซึมในยีน 5,10-เมทิลินเตตราไฮโดรโฟเลต รีดักเตสของมารดาเป็นปัจจัยเสี่ยงของไตรโซมี 21 (MATERNAL AGE AND A POLYMORPHISM IN A MATERNAL 5,10-METHYLENE TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE AS RISK FACTORS OF TRISOMY 21) อาจารย์ที่ปรึกษา:รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR)* ในมารดา กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบไตรโซมี 21

รูปแบบการศึกษา การวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบ match case-control study

ประชากรที่ศึกษา สตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบไตรโซมี 21 ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และที่โรงพยาบาลราชานุกูล

วิธีการศึกษา ทำการศึกษาในมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบไตรโซมี 21 ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลราชานุกูล (case) และกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และคลอดบุตรที่ปกติ (control) โดยทำการเจาะเลือดแล้ววิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบไตรโซมี 21

ผลการศึกษาพบว่า ประชากรตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้น กลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบไตรโซมี 21 ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และที่โรงพยาบาลราชานุกูลจำนวน 109 คน และกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และคลอดบุตรที่ปกติจำนวน 186 คน พบว่าอายุเฉลี่ยของมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์เท่ากับ  $33.9 \pm 5.81$  ปี และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ  $32.4 \pm 5.12$  ปี เมื่อทำการวิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) พบว่าความถี่ของอัลลีล *MTHFR* 677T เป็น 0.15 และความถี่ของอัลลีล *MTHFR* 1298 C เท่ากับ 0.28 ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยมีการวิจัยในประเทศไทย เมื่อนำความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *MTHFR* ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น T เปรียบเทียบในประชากรทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

สรุป โพลิมอร์ฟิซึม *MTHFR* 677T และ 1298C ในสตรีไทยไม่มีความสัมพันธ์กับการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์  
สาขาวิชากุมารเวชศาสตร์  
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

## #4774734030 : MAJOR PEDIATRICS

KEY WORD: DOWN SYNDROME, *MTHFR* GENE, POLYMORPHISM

MISS TACHAKWAN INTAPUNTEE: MATERNAL AGE AND A POLYMORPHISM  
IN A MATERNAL 5,10-METHYLENE TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE  
AS RISK FACTORS OF TRISOMY 21. THESIS ADVISOR : ASSOC PROF.  
VORASUK CHOTLERKUK, 34pp. ISBN 974-17-6849-4

**Objective:** to study an association between *MTHFR* 677C → T, 1298A → C,  
polymorphisms and the risks of Thai women having children with Trisomy 21

**Subjects:** women who have children with Down syndrome coming to King Chulalongkorn Memorial Hospital and Rachanukul Hospital.

**Method :** The subjects in this study consist of 2 groups: 1) controls are women attended antenatal care clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital and had healthy child, 2) Case mothers are women who have children with Trisomy 21 coming to Rachanukul hospital and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok. Polymorphisms in *MTHFR* gene were analyzed by PCR-RFLP. The categorical data were analyzed for statistical significance ( $p < 0.05$ ) by Chi square.

**Result :** We analyzed 109 case mothers and 186 control mothers for the polymorphisms. There were no significant difference between groups in term of mean age at conception. Our data show that *MTHFR*677T and *MTHFR*1298C allele frequencies in Thai are 0.15 and 0.28, respectively, similar to those previously reported. The results found no statistic difference in the allele and genotype frequencies of *MTHFR* 677C → T and *MTHFR* 1298A → C between Thai mothers of Down syndrome and controls.

**Conclusion :** no association between polymorphisms of *MTHFR* gene and Trisomy 21.

Department pediatrics

Student's signature.....

Field of study pediatrics

Advisor's signature.....

Academic Year 2004

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์วรวงศ์ ภู่งงศ์ ภาควิชาสูติ- นรีเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างจากกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ขอขอบคุณนายแพทย์วิรุทธิ์ ประพันธ์พนธ์ โรงพยาบาลราชานุกูลที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเลือดของมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ที่รักษาที่โรงพยาบาลราชานุกูลเข้ารับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนางสาวทิวรัตน์ สิริวิวัฒน์นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ประจำหน่วยพันธุกรรม ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งในการเก็บตัวอย่างเลือดและตรวจหาการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ปกครองที่มีบุตรป่วยเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่านที่ร่วมเป็นส่วนหนึ่งของการทำวิจัยนี้

ท้ายสุดผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญแผนภูมิ.....	ญ
บทที่ 1 : บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
คำถามของการวิจัย.....	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐาน.....	4
กรอบแนวคิดในการทำวิจัย.....	5
รูปแบบการวิจัย.....	5
ระเบียบวิธีการวิจัย.....	5
การรวบรวมข้อมูล.....	6
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทำวิจัย.....	6
การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติการ.....	7
งบประมาณ.....	7
บทที่ 2 : เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
แนวคิดและทฤษฎี.....	8
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3 : วิธีดำเนินการวิจัย.....	10
ประชากร.....	10
วัสดุและวิธีการ.....	10
บทที่ 4 : ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	13
กลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา.....	13

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

กลุ่มประชากรที่อายุน้อยกว่า 30ปี.....	19
กลุ่มประชากรที่อายุมากกว่า 30 ปี.....	25
บทที่ 5 : สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	31
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	31
ข้อเสนอแนะ.....	32
รายการอ้างอิง.....	35
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	37



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่1	แสดงอายุเฉลี่ยของกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ.....	13
ตารางที่2	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง677และ1298.....	14
ตารางที่3	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง677จากCเป็นT.....	16
ตารางที่4	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง1298จากA เป็นC.....	17
ตารางที่5	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFRในแบบต่างๆ.....	18
ตารางที่6	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง677และ1298ในกลุ่มมารดาที่อายุน้อยกว่า30ปี.....	19
ตารางที่7	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง677และ1298ในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	20
ตารางที่8	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง677จากCเป็นTในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	22
ตารางที่9	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง1298จากA เป็นCในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	23
ตารางที่10	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFRในแบบต่างๆในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	24
ตารางที่11	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง677และ1298ในกลุ่มมารดาที่อายุมากกว่า30ปี.....	25
ตารางที่12	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง677และ1298ในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	26
ตารางที่13	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง677จากCเป็นTในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	28
ตารางที่14	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง1298จากA เป็นCในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	29
ตารางที่15	แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFRในแบบต่างๆในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	30

## สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่1 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง677.....	14
แผนภูมิที่2 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง1298.....	15
แผนภูมิที่3 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มที่ตำแหน่ง677จากCเป็นT.....	16
แผนภูมิที่4 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มที่ตำแหน่ง1298จากAเป็นC.....	17
แผนภูมิที่5 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง677ในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	20
แผนภูมิที่6 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง1298ในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	21
แผนภูมิที่7 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มที่ตำแหน่ง677จากCเป็นTในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	22
แผนภูมิที่8 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มที่ตำแหน่ง1298จากAเป็นCในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุน้อยกว่า30ปี.....	23
แผนภูมิที่9 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง677ในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	26
แผนภูมิที่10 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มของยีนMTHFRที่ตำแหน่ง1298ในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	27
แผนภูมิที่11 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มที่ตำแหน่ง677จากCเป็นTในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	28
แผนภูมิที่12 แสดงความถี่ของโพลีเมอร์พีซีเอ็มที่ตำแหน่ง1298จากAเป็นCในกลุ่มมารดา ที่แต่งงานเมื่ออายุมากกว่า30ปี.....	29

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

กลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) เป็นความผิดปกติทางโครโมโซมที่พบบ่อยที่สุด และเป็นสาเหตุที่พบบ่อยในกลุ่มโรคทางพันธุกรรมที่ทำให้ปัญญาอ่อน อุบัติการณ์ของการเกิดกลุ่มอาการดาวน์ในประชากรทั่วไปประมาณ 1/600-1/1,000 ของทารกแรกเกิด เด็กหญิงและเด็กชายมี โอกาสเกิดกลุ่มอาการดาวน์พอกัน เด็กที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์จะมีลักษณะที่สังเกตเห็นได้ตั้งแต่วัยทารก ได้แก่ หน้าแบน, ศีรษะแบน, กระทบม่านกว้างหางตาชี้ขึ้น, มีแผ่นผิวหนังมาปิดที่หัวตาด้านใน, โขนูเล็กเกาะต่ำและพับ, ผิวหนังย่นที่ลำคอด้านหลัง, คอสั้น, มือกว้างสั้น, ลายมือมีเส้นขวางเส้นเดียว, นิ้วก้อยโค้ง และอาจมีขีดขวางขีดเดียว, ช่องระหว่างนิ้วเท้าที่ 1 และ 2 กว้าง, มีร่องลึกลงมาทางฝ่าเท้าและกล้ามเนื้ออ่อนปวกเปียก นอกจากนี้ยังพบมีความพิการอื่นที่พบบ่อยขึ้นในเด็กที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ ได้แก่

1. Congenital heart anomaly พบได้ 30% ของผู้ป่วย ที่พบบ่อยคือ Endocardial cushion defect, VSD
2. Gastrointestinal tract anomaly พบได้ 12% ที่พบบ่อยคือ Duodenal atresia, Tracheoesophageal fistula, Hirschsprung disease, Imperforate anus
3. Endocrine disorder พบได้ประมาณ 15% โดยมักพบ hypothyroidism ร่วมด้วย จึงควรตรวจเลือดเพื่อตรวจการทำงานของต่อมไทรอยด์ตั้งแต่แรกคลอด อายุ 6 เดือน, 1 ปี และทุกปีไปจนอายุ 15 ปี
4. Hematologic disorder เมื่อแรกเกิดทารกที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์จะพบ Transient myeloid leukemia, polycythemia, prolonged physiologic jaundice ได้บ่อยกว่าทารกทั่วไป
5. Eye abnormality ได้แก่ congenital nystagmus, Glaucoma, Cataract
6. Hearing disorder ได้แก่ conductive hearing loss, otitis media
7. Skeletal abnormality ได้แก่ Atlantoaxial joint instability พบได้ 10-14% ถ้ามีอาการที่สงสัย ควรตรวจค้นและรักษาเนื่องจากอาจทำให้เกิด spinal cord compression ได้
8. Immunologic disorder พบว่า T cell และ B cell มีจำนวนและหน้าที่ลดลง

### ความผิดปกติของโครโมโซม

แม้ว่าผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์จะมีลักษณะภายนอกเฉพาะที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค แต่ควรทำการตรวจโครโมโซมในผู้ป่วยที่สงสัยกลุ่มอาการดาวน์ทุกคนเพื่อยืนยันการวินิจฉัยและให้คำปรึกษาพันธุกรรมได้อย่างถูกต้อง

ความผิดปกติทางโครโมโซมที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการดาวน์ ได้แก่

### 1. Trisomy 21

พบได้ร้อยละ 95 ของกลุ่มอาการดาวน์ โดยจะพบว่าผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ส่วนใหญ่เกิดจากการที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 โครโมโซมทำให้มีโครโมโซมคู่ที่ 21 มี 3 โครโมโซมในแต่ละเซลล์ สาเหตุเชื่อว่าเกิดจากการไม่แยกตัวของโครโมโซม (Chromosome nondisjunction) ในระยะไมโอซิส (Meiosis I)

### 2. Robertsonian Translocation

การที่โครโมโซมคู่ที่ 14 มาชิดติดกับโครโมโซมคู่ที่ 21 พบได้ร้อยละ 4 ของกลุ่มอาการดาวน์

### 3. Mosaicism

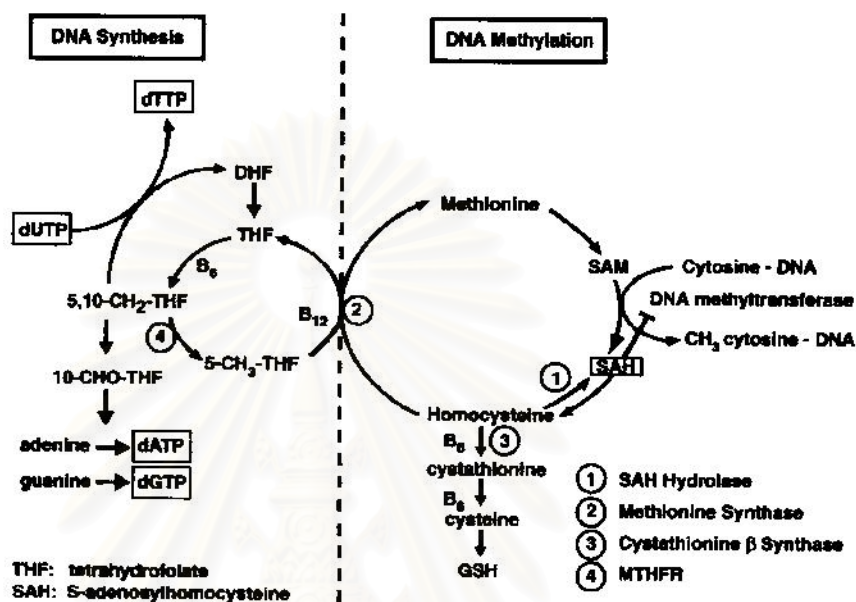
การที่มีโครโมโซมทั้งปกติและผิดปกติในคนเดียวกัน พบได้ร้อยละ 1

คนไข้ที่เป็นเป็นกลุ่มอาการดาวน์ส่วนใหญ่เกิดจาก Trisomy 21 มากที่สุด จากการศึกษาพบว่าโครโมโซมที่ 21 ที่เกินมา มาจากมารดาร้อยละ 80 อีกร้อยละ 20 มาจากบิดา โดยโอกาสเกิดกลุ่มอาการนี้ในบุตรจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของสตรีที่ตั้งครรภ์ พบว่าอุบัติการณ์ของบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์เป็น 1/350 ในมารดาที่คลอดขณะอายุ 35 ปี และจะเพิ่มเป็น 1/100 ขณะอายุ 40 ปี (1) แต่ถึงแม้ว่าอายุมารดาที่มากขึ้นจะเป็นปัจจัยหลักในการมีบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเด็กที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์จำนวนไม่น้อยเกิดจากมารดาที่มีอายุน้อยกว่า 30 ปี

สาเหตุของการไม่แยกตัวของโครโมโซมในระยะไมโอซิส (Nondisjunction) นั้นได้มีการศึกษาพบว่า genomic DNA hypomethylation มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแยกตัวของโครโมโซมที่ผิดปกติ (2) และพบมีรายงานว่าการบกพร่องของfolateและหมู่methylในร่างกายเป็นผลทำให้เกิด DNA hypomethylation ทำให้มีการศึกษาถึงปัจจัยเสี่ยงและกลไกการไม่แยกตัวของโครโมโซมว่ามีความเกี่ยวข้องกับโพลิมอร์ฟิซึมของยีนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกในมารดา ซึ่งส่งผลให้folateลดลงทำให้เกิด DNA hypomethylation อาจเป็นสาเหตุของการที่มารดามีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ได้ (3)

Folate เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของfolateและ homocysteine เมื่อมารดาเกิดภาวะขาดหรือได้รับ folate ไม่เพียงพอระหว่างตั้งครรภ์ ระดับของ 5-methyl tetrahydrofolate (5-Methyl-THF) ซึ่งเป็นอนุพันธ์หลักของ folate ในระบบหมุนเวียนเลือดจะลดต่ำลง ส่งผลถึงการยับยั้งการ remethylation ของ homocysteine กลับเป็น methionine ทำให้ระดับของ homocysteine ในพลาสมาสูงขึ้นส่งผลถึงการเจริญเติบโตของตัวอ่อน นอกจากนั้นการลดระดับของ methionine ซึ่งเป็นตัวให้ methyl group แก่ DNA ซึ่งอาจทำให้เกิด DNA hypomethylation ส่งผลต่อการไม่แยกตัวของโครโมโซมได้ (4)

ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ folate มีเอนไซม์ที่ควบคุมหลายตัวดังนั้นหากเกิดความผิดปกติของเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเมแทบอลิซึมของ folate และ homocysteine ได้แก่ 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase reductase (MTRR), methionine synthase (MTR) ก็จะมีผลกับการเกิด DNA hypomethylation ได้ (รูป 1)



รูปที่ 1 เอนไซม์ MTHFR ในกระบวนการเมแทบอลิซึม

รูปที่ 1 แสดงถึงกระบวนการเมแทบอลิซึมของ folate พบว่าเอนไซม์ MTHFR มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน 5,10-methylene tetrahydrofolate เป็น 5-methylene tetrahydrofolate ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ให้ methyl กับ homocysteine ในกระบวนการ remethylation เป็น methionine

Methionine เป็นสารตั้งต้นจะเปลี่ยนเป็น S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นตัวสำคัญที่ให้หมู่ methyl group แก่ DNA, RNA, Protein และ Phospholipid เมื่อโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 เปลี่ยนจาก C เป็น T ทำให้ Alanine ที่ตำแหน่ง 677 ถูกแทนที่ด้วย Valine ซึ่งทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับคนที่ปกติที่มี genotype เป็น C/C ถ้าเป็น C/T การทำงานของเอนไซม์ MTHFR จะลดลงประมาณร้อยละ 35 และลดลงร้อยละ 70 ถ้าเป็น T/T ซึ่งผลจากการทำงานของ MTHFR ที่ลดลงทำให้ระดับ homocysteine เพิ่มขึ้นและ methionine ลดลง ส่งผลให้ S-adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็นตัวเติมหมู่ methyl แก่ DNA มีจำนวนน้อยลงส่งผลให้เกิด DNA hypomethylation และในต่างประเทศมีการศึกษาว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 เพิ่มภาวะเสี่ยงต่อการไม่แยกตัวของโครโมโซมที่ 21 และการเกิดกลุ่มอาการดาวน์

ส่วนโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C จะทำให้ Alanine ถูกแทนที่ด้วย Glutamine ทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับที่ตำแหน่ง 677

แต่เคยมีการศึกษาพบว่าโพลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่ง 1298 มีความสัมพันธ์กับการเกิด neural tube defect และยังไม่มีการศึกษามากนักว่ามีความสัมพันธ์อย่างไรกับการที่มารดามีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์เมื่อเทียบกับตำแหน่ง 677

แต่อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาต่างๆเป็นการศึกษาในประชากรที่แตกต่างกัน อีกทั้งผลการศึกษามีความขัดแย้งกัน และยังไม่เคยมีการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในสตรีไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ทางคณะผู้วิจัยจึงดำเนินการศึกษานี้ขึ้นซึ่งหากพบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR มีความสัมพันธ์กับโอกาสเสี่ยงที่สตรีต่อการมีบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ ผลของการศึกษาที่ได้นี้อาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงอัตราเสี่ยงต่อการที่สตรีตั้งครรภ์จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ และข้อมูลที่ได้นี้อาจนำไปใช้ในทางเวชปฏิบัติ เช่น ใช้เป็นการตรวจเบื้องต้นในสตรีที่ตั้งครรภ์ที่อายุน้อยกว่า 35 ปี หากพบว่ามี mutation ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T หรือที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ก็อาจเป็นข้อบ่งชี้ให้ทำการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

#### **คำถามของการวิจัย (Research Question)**

คำถามหลัก - โพลิมอร์ฟิซึมในยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของมารดามีความสัมพันธ์กับไตรโซมี 21 หรือไม่

คำถามรอง - โพลิมอร์ฟิซึมในยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของมารดามีความสัมพันธ์กับไตรโซมี 21 ในมารดาที่อายุน้อยกว่าหรือมากกว่า 30 ปี

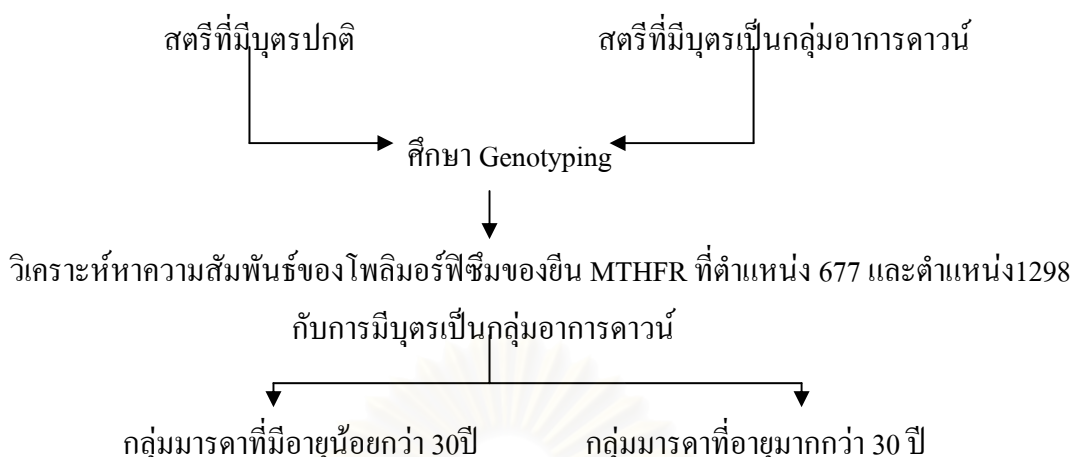
#### **วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)**

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นไตรโซมี 21

#### **สมมติฐาน (Hypothesis)**

โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของมารดามีความสัมพันธ์กับไตรโซมี 21

### กรอบแนวคิดในการทำวิจัย (Conceptual Framework)



### รูปแบบการวิจัย (Study design)

การศึกษาวินิจฉัยเชิงวิเคราะห์แบบ matched case-control study

### ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

#### 1) ประชากรเป้าหมาย (target population)

- สตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบ Trisomy 21

#### 2) ประชากรตัวอย่าง (sample population)

- กลุ่มศึกษา (case) : สตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ที่เป็นผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาและรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และ สตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ที่เป็นผู้ป่วยของโรงพยาบาลราชานุกูล
- กลุ่มควบคุม (control) : สตรีที่มาฝากครรภ์ที่แผนกสูติ-นรีเวชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และคลอดบุตรที่ไม่เป็นกลุ่มอาการดาวน์

#### 3) การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size)

ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ไม่สามารถคำนวณขนาดตัวอย่างได้ ดังนั้นในทางปฏิบัติจะทำการรวบรวมประชากรตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่ทำได้ (as many as possible)

#### 4) การเก็บเลือด

หลังจากได้รับการยินยอมจากสตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และสตรีที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทำการเจาะเลือด 3 มิลลิลิตร ใส่หลอด polypropylene ที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA

#### 5) หาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR

โดยการสกัด DNA แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนที่ต้องการโดยวิธี PCR จากนั้นทำการแยกและตรวจชิ้นส่วน DNA แล้วตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ

## 6) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

### การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

#### ขั้นตอนการดำเนินการ

- รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างได้แก่ อายุ , ประวัติการมีบุตร, ประวัติสมาชิกในครอบครัวที่มีบุตรผิดปกติ
- เก็บรวบรวมการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และตำแหน่ง 1298

### การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative data) ได้แก่ ข้อมูลประวัติซึ่งเป็นจำนวนเต็ม (discrete variable) ใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยการสรุปข้อมูล จำนวนเป็นร้อยละหรือสัดส่วน และนำเสนอในรูปแบบตารางหรือแผนภูมิ
2. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR กับการเกิดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ โดยใช้ chi-square test และจะยอมรับสมมติฐานเมื่อ  $p < 0.05$
3. หาขนาดของความสัมพันธ์จากค่า odd ratio (OR) โดยพิจารณาช่วง 95% Confidence interval

### ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

การดำเนินการวิจัยจำกัดเฉพาะการศึกษาในหลอดทดลอง อีกทั้งมีลายเซ็นยินยอมจากผู้เข้าร่วมโครงการจึงไม่มีปัญหาทางจริยธรรม

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (Expected benefits and application)

ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงอัตราเสี่ยงต่อการที่สตรีตั้งครรภ์จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ และหากพบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกมีความสัมพันธ์กับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ สามารถนำมาใช้ประกอบสำหรับการเป็นข้อบ่งชี้ในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดในสตรีตั้งครรภ์ที่อายุน้อยกว่า 35 ปีแต่มีโพลิมอร์ฟิซึมของยีนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์

### อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการแก้ไข (Obstacle) ไม่มี



การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติการ (Administration and time schedule)

ที่	ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	(ระยะเวลา : เดือน)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	ดำเนินการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างและศึกษา	←											→
2.	การตรวจทางห้องปฏิบัติการ	←											→
3.	การรวบรวมข้อมูล						←	→					
4.	การวิเคราะห์ผล								←	→			
5.	การเขียนรายงาน											←	→

งบประมาณ (Budget)

Extract DNA	100	บาท/คน
PCR and restriction enzyme analysis	800	บาท/คน/2 ครั้ง
300 คน	360,000	บาท
ค่าใช้จ่ายในการพิมพ์และเข้าเล่ม	7,000	บาท
รวมทั้งสิ้น	430,000	บาท

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

กลุ่มอาการดาวน์เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม โดยพบว่าสาเหตุทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการดาวน์ส่วนใหญ่เกิดจากการที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 โครโมโซม (95%เป็นแบบ Trisomy 21, 4%เป็นแบบChromosome translocation, 1%เป็นแบบ Mosaicism) และโครโมโซมที่เกินมาเป็นโครโมโซมจากมารดา 80% และจากบิดา 20% จากการศึกษาพบว่ากลไกการที่ทำให้เกิดโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินเกิดจากการไม่แยกตัวของโครโมโซมในระยะ meiosis I

ดังนั้น หากมีการกลายพันธุ์ของยีน Methylene tetrahydrofolate reductase ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของ Folate และ DNA methylation ทำให้มีการทำงานของเอนไซม์ลดลงเกิด DNA hypomethylation มีผลต่อการไม่แยกตัวของโครโมโซมและการเกิดไตรโซมี 21 ได้

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปีค.ศ. 1999 Jame SJ และคณะ ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T กับความเสี่ยงของสตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ในประชากร North American เนื่องจากมีหลักฐานการศึกษาทั้งทางคลินิกและการวิจัยแสดงว่า ความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกสามารถทำให้เกิด DNA hypomethylation และการแยกตัวของโครโมโซมที่ผิดปกติ จึงสันนิษฐานว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T อาจเป็นสาเหตุของการไม่แยกตัวของโครโมโซมและการเกิดกลุ่มอาการดาวน์แบบ Trisomy 21 ผลจากการศึกษาพบว่าสตรีในกลุ่มประชากร North American ที่ทำการศึกษาพบว่ามีโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T มีโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มากกว่าประชากรทั่วไป 2.6 เท่า (5)

ปีค.ศ. 2000 HobbsCA และคณะ ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T กับโอกาสเสี่ยงของสตรีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในเชื้อชาติ North American โดยใช้กลุ่มประชากรที่นำมาศึกษามากกว่าการศึกษาของ Jame SJ และคณะ จากการศึกษาพบว่าสตรีที่มีโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T มีโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มากกว่าประชากรทั่วไป 1.91 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าสตรีที่มีโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR แบบ CT และ TT มีโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มากขึ้น 4.08(6)

ค.ศ. 2001 Terry J. Hassold และคณะ ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างสาเหตุของการไม่แยกตัวของโครโมโซมในมนุษย์กับโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดโฟลิกในร่างกายกับการที่มารดามีบุตรเป็นกลุ่มอาการที่เป็น Trisomy แบบต่างๆ เช่น Trisomy 13, Trisomy 15, Trisomy 18, Trisomy 22 และอื่นๆ พบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ในมารดาที่มีบุตรเป็น Trisomy แบบต่างๆ ไม่มีความสัมพันธ์กันในทางสถิติ (7)

ค.ศ. 2002 O'Leary VB และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T กับโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในสตรีที่มีเชื้อชาติ Irish พบว่าสตรีที่มีโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T มีโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มากขึ้น 1.13 เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (8)

ค.ศ. 2002 Chadeaux-Vekmans และคณะ ได้ศึกษาความถี่ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T กับสาเหตุของการเกิดกลุ่มอาการดาวน์ในสตรีที่ตั้งครรภ์ชาวฝรั่งเศส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของความถี่ของยีน CC, CT และ TT ระหว่างมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์กับกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (9)

ค.ศ. 2002 Stuppia L และคณะ ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T กับโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในสตรีเชื้อชาติ Italian พบว่าความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (กลุ่มควบคุม) สูงกว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (กลุ่มศึกษา) และไม่สนับสนุนในการเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (10)

ค.ศ. 2003 Paolo Bosco และคณะ ได้ทำการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในสตรีเชื้อชาติ Sicily กับการที่สตรีจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ โดยสันนิษฐานว่าการที่มารดามีการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ทั้ง 2 ตำแหน่ง จะเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มากขึ้น ผลของการศึกษาพบว่าสตรีที่มีโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และ 1298 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดกลุ่มอาการดาวน์ในสตรีที่ตั้งครรภ์ (11)

ค.ศ. 2003 รองศาสตราจารย์นายวรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ และคณะ ได้ทำการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มบิดาและมารดาด้วยความสัมพันธ์ของการมีบุตรเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ชาวไทย โดยรวบรวมบิดาและมารดาที่มีบุตรเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่จำนวน 109 คน เทียบกับกลุ่มบิดามารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 202 คน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 แต่พบว่ามีความถี่ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 แบบ CT และที่ตำแหน่ง 1298 แบบ AC ในกลุ่มบิดามารดาที่มีบุตรเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่มากกว่ากลุ่มบิดามารดาที่มีบุตรปกติถึง 4.43 เท่าและมีนัยสำคัญทางสถิติ (12)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### ประชากร

##### ประชากรเป้าหมาย (target population)

สตรีวัยเจริญพันธุ์ชาวไทย ที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบ Trisomy 21

##### ประชากรตัวอย่าง (sample population)

- กลุ่มศึกษา (case) : สตรีไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ที่เป็นผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการตรวจและรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และสตรีไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ที่เป็นผู้ป่วยของโรงพยาบาลราชานุกูล
- กลุ่มควบคุม (control) : สตรีไทยที่มาฝากครรภ์ที่แผนกสูติ-นรีเวชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และคลอดบุตรปกติและไม่เป็นกลุ่มอาการดาวน์

##### กฎเกณฑ์การคัดเลือกประชากรเข้ามาทำการศึกษา (Inclusion Criteria)

สตรีไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ Trisomy 21

##### กฎเกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

สตรีไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ที่ไม่ได้เกิดจากโพลิมอร์ฟิซึมแบบ Trisomy 21

#### วัสดุและวิธีการ

##### 1. การประเมินทางคลินิก

ผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ พร้อมมารดาที่มารับการตรวจและรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แผนกกุมารเวชศาสตร์และที่โรงพยาบาลราชานุกูล จะได้รับการซักประวัติ, ประวัติคนในครอบครัวที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มาก่อนหรือไม่, ทำการตรวจร่างกายอย่างละเอียดและทำการตรวจทางโครโมโซมเพื่อหาโพลิมอร์ฟิซึมเพื่อหาว่าเป็นแบบใด

##### 2. การเก็บตัวอย่างเลือด

คัดเลือกกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบ Trisomy 21 เพื่อรับการอธิบายถึงรายละเอียดของโครงการและลงลายชื่อในใบยินยอมเข้ารับการศึกษาวินิจฉัย แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือด 3 มิลลิลิตรจากผู้ป่วยและมารดาเก็บในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มี EDTA

- จะะเลือดจากข้อพับแขนของมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อคน ใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที

### 3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

#### 3.1 การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวที่ได้จากเลือด มีขั้นตอนดังนี้

- ทิ้งส่วนชั้นบนและเก็บส่วนกลางที่มีเม็ดเลือดขาว (Buffy coat) ใส่ลงในหลอด polypropylene หลอดใหม่ หลังจากนั้นใส่ Lysis buffer (เพื่อให้เม็ดเลือดขาวแตกได้ DNA ออกมา) นำมาผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่า
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 g เป็นเวลานาน 8 นาที จากนั้นทิ้งส่วนชั้นบน
- เติม Lysis buffer อีก 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าแรงๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 8 นาทีที่ 1,000 g
- ทิ้งส่วนชั้นบน หลังจากนั้นเติม Lysis buffer 2 จำนวน 900  $\mu$ l , สารละลาย Proteinase K จำนวน 10  $\mu$ l ( 20mg Proteinase K ละลายใน 1 มิลลิลิตรของ 1% SDS-2mM EDTA ซึ่งควรเตรียมไว้ก่อนใช้ 30 นาที) และ 10% SDS จำนวน 50  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าแรงเป็นเวลา 15 วินาที Lysis buffer 2 จะช่วยให้ Proteinase K ซึ่งเป็นตัวย่อยโปรตีนทำงานได้ดีขึ้น
- บ่มที่ 37<sup>o</sup> C ซ้ำมคืน
- เติม Phenol-chloroform-isoamyl alcohol จำนวน 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าแรงๆ เป็นเวลานาน 15 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 เป็นเวลา 5 นาที
- ถ่ายส่วนชั้นบนจากแต่ละหลอด (ซึ่งมี DNA) ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
- เติม 3M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 50  $\mu$ l และ 100% ethanol ปริมาตร 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดไปมา นำไปบ่มที่ -20<sup>o</sup> C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาตกตะกอน DNA โดยปั่นเหวี่ยงที่ 14,000rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนบนทิ้ง
- ล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% ethanol (เพื่อล้างเกลือและ phenol ที่ยังตกค้างออก) คว่ำหลอดไว้บนกระดาษซับจนตะกอน DNA แห้งสนิท
- ละลาย DNA ใน 100  $\mu$ l และบ่มที่ 37<sup>o</sup> C จนกว่า DNA จะละลาย
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup> C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

#### 3.2 หาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR

นำ DNA ที่ได้มาวิเคราะห์โดยผ่านกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR) และ Restriction enzyme digestion โดยวิธีการทำ PCR ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

### 3.3 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย

#### 4.การรวบรวมข้อมูล

- รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างได้แก่ อายุ, ประวัติการมีบุตร, ประวัติสมาชิกในครอบครัวที่มีบุตรผิดปกติ
- เก็บรวบรวมการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และตำแหน่ง1298

#### 5.การวิเคราะห์ข้อมูล

- การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative data) ได้แก่ ข้อมูลประวัติซึ่งเป็นจำนวนเต็ม (discrete variable) ใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยการสรุปข้อมูล จำนวนเป็นร้อยละหรือสัดส่วน และนำเสนอในรูปแบบตารางหรือแผนภูมิ
- การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR กับการเกิดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ โดยใช้ chi-square test และจะยอมรับสมมติฐานเมื่อ  $p < 0.05$
- หาขนาดของความสัมพันธ์จากค่า odd ratio (OR) โดยพิจารณาช่วง 95% Confidence interval

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### กลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา (Study population)

คณะผู้วิจัยได้ทำการรวบรวมตัวอย่างเลือดของกลุ่มมารดาไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) รวมทั้งหมด 108 คน โดยเป็นกลุ่มมารดาที่บุตรมารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 40 คน ส่วนอีก 68 คนเป็นกลุ่มมารดาที่บุตรมารับการรักษาที่โรงพยาบาลราชานุกูล และตัวอย่างเลือดจากกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่แผนกสูตินรีเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (control) จำนวน 187 คน โดยภายหลังได้ทำการติดตามว่าผู้ที่เข้ารับการศึกษานี้ในกลุ่มควบคุมมาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และบุตรที่คลอดออกมาปกติจำนวน 186 คน ส่วนอีก 1 รายได้คลอดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์แบบ Trisomy 21 จึงย้ายไปอยู่ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แทน

ดังนั้นประชากรที่เข้ารับการศึกษานี้เป็นกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) จำนวน 109 คน และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) จำนวน 186 คน รวมทั้งสิ้น 295 คน

เมื่อทำการวิเคราะห์หาอายุโดยเฉลี่ยของประชากรแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) มีอายุเฉลี่ยขณะตั้งครรภ์เท่ากับ 32.4 ปี ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) มีอายุเฉลี่ย 33.9 ปีซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 1 แสดงอายุเฉลี่ยของกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

	Case (n = 109)	Control (n = 186)	Unpaired T test	P value
Age at conception ( X ± SD )	33.9 ± 5.81	32.4±5.12	2.31	0.02

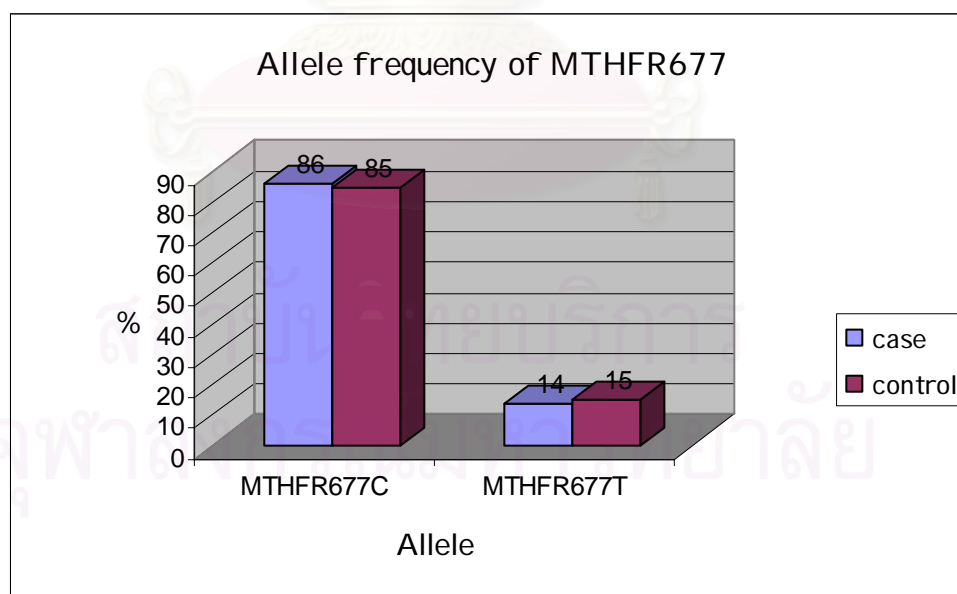
#### ความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึม (Allele frequency)

จากตัวอย่างเลือดที่ได้จากกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม นำมาหาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 แล้วนำมาวิเคราะห์หาความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆ พบว่าการกระจายของข้อมูลทั้ง 2 กลุ่มอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium และความถี่ของการกลายพันธุ์

ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ของประชากรทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ( $p=0.80$ ) และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของประชากรทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบกันพบว่าไม่แตกต่างกัน ( $p=0.564$ ) ดังแสดงในตารางที่ 2

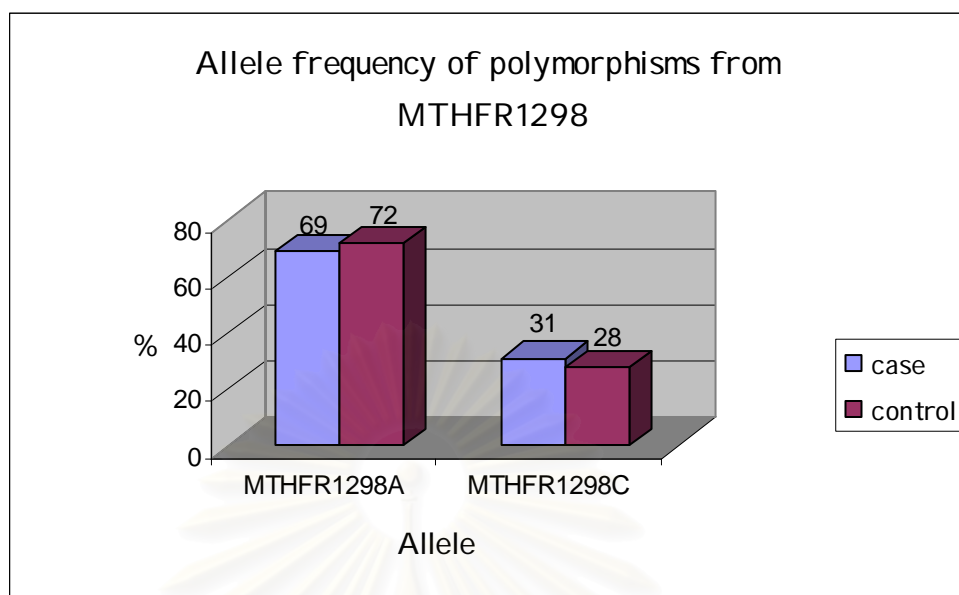
ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

Genotype	Allele	Case	Control	$\chi^2$	P value
		number(%)	number(%)		
MTHFR677	C	188(86)	318(85)	0.064	0.8
	T	30(14)	54(15)		
MTHFR1298	A	151(69)	266(72)	0.333	0.564
	C	67(31)	106(28)		



แผนภูมิที่ 1 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)





แผนภูมิที่ 2 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

**ความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆกับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์**

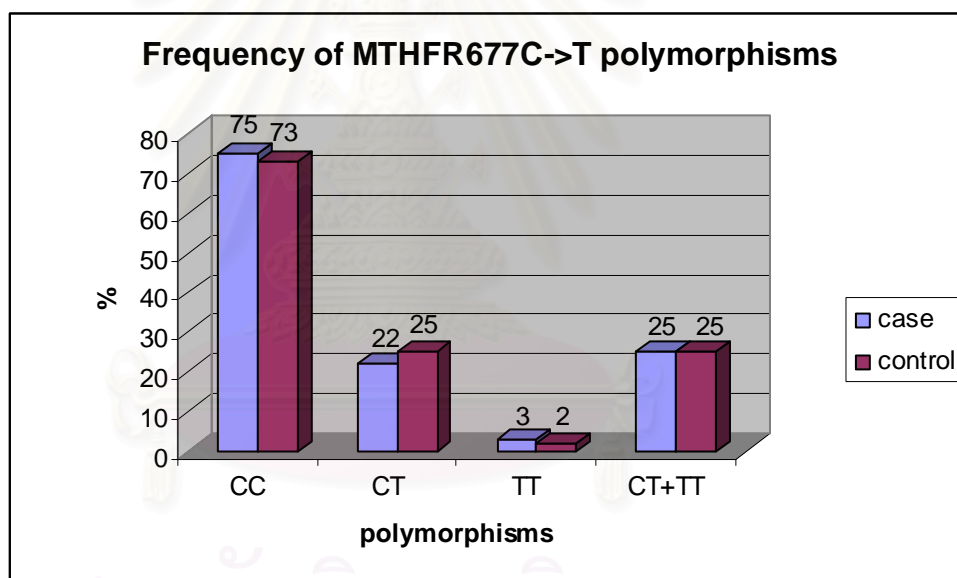
#### 1. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T

จากการวิเคราะห์และรวบรวมความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ ได้แก่ CC, CT และ TT พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์จำนวน 109 คนมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 82 คน (คิดเป็น 75%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT จำนวน 24 คน (22%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT จำนวน 3 คน (3%) ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 186 คน มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 136 คน (73%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT จำนวน 46 คน (25%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT จำนวน 4 คน (2%)

เมื่อนำความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT และ TT มาเปรียบเทียบกับความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติมาหาค่า Odd ratio ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 แบบ CT กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ส่วนมารดาที่มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT พบว่ามีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์มากกว่าปกติ 1.29 เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3, แผนภูมิที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 677 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95% CI)
	n = 109 (%)	n = 186 (%)	
CC	82 (75)	136 (73)	Reference
CT	24 (22)	46 (25)	0.86 (0.47-1.56)
TT	3 (3)	4 (2)	1.29 (0.22-6.96*)
CT+TT	27 (25)	50 (25)	0.80 (0.44-1.44)



แผนภูมิที่ 3 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

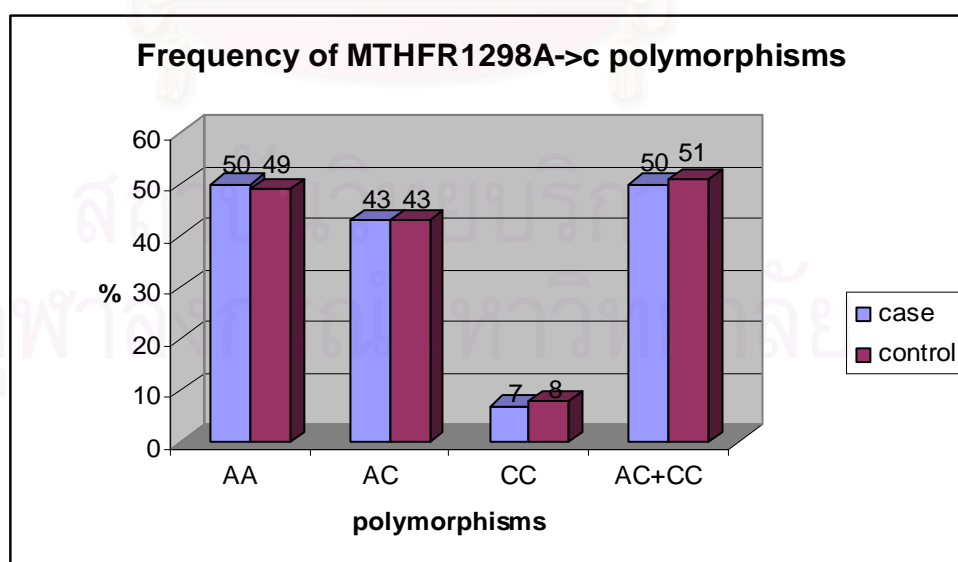
## 2. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

จากการวิเคราะห์และรวบรวมความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ ได้แก่ AA, A และ CC พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์จำนวน 109 คนมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA จำนวน 53 คน (50%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC จำนวน 47 คน (43%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ

CC จำนวน 9 คน (7%) ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 186 คน มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA จำนวน 93 คน (49%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC จำนวน 80 คน (43%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 13 คน (8%)

เมื่อนำความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC และ CC มาเปรียบเทียบกับความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติมาหาค่า Odd ratio ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C แบบ AC กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ส่วนมารดาที่มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC พบว่ามีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์มากกว่าปกติ 1.20 เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4, แผนภูมิที่ 4) ตารางที่ 4 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 1298 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95% CI)
	n = 109 (%)	n = 186 (%)	
AA	53 (50)	93 (49)	Reference
AC	47 (43)	80 (43)	1.00 (0.61-1.67)
CC	9 (7)	13 (8)	1.20 (0.45-3.13)
AC+CC	56 (50)	93 (51)	1.06 (0.67- 1.74)



แผนภูมิที่ 4 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

### 3. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677จากC เป็น Tและที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

เมื่อนำความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677จากC เป็น Tและที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C มารวมกันและนำมาหาความสัมพันธ์กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ พบว่า ความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFRที่ตำแหน่ง 677หรือ 1298แบบ CC/AC, CC/CC, CT/AA, CT/AC, CT/CC, TT/AC,และTT/CCเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC/AAซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ส่วนมารดาที่มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT/AA พบว่ามีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์มากกว่าปกติ 1.26เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่5)

ตารางที่5แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFRในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 677/1298 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95% CI)
	n = 109(%)	n = 186(%)	
CC/AA	37 (34)	59 (32)	Reference
CC/AC	38 (35)	64 (34)	1.02 (0.60-1.73)
CC/CC	7 (6)	13 (7)	0.91 (0.32-2.55)
CT/AA	13 (12)	30 (16)	0.70 (0.33-1.49)
CT/AC	9 (8)	16 (9)	0.96 (0.37-2.40)
CT/CC	2 (2)	No	ND
TT/AA	3 (3)	4 (2)	1.26 (0.22-6.96*)
TT/AC	No	No	ND
TT/CC	No	No	ND

No = not observed, ND = not determined , Ref.= Reference category

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 กับโอกาสเกิดบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในมารดาที่อายุน้อยกว่า 30 ปี

#### กลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา (Study population)

จากการรวบรวมตัวอย่างเลือดของกลุ่มมารดาไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) รวมทั้งหมด 109 คน มีมารดาที่มีอายุขณะตั้งครรภ์น้อยกว่า 30 ปี จำนวน 32 ราย และตัวอย่างเลือดจากกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่แผนกสูติรีเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (control) จำนวน 186 คน มีมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปี จำนวน 64 ราย

เมื่อทำการวิเคราะห์หาอายุเฉลี่ยของประชากรที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า 30 ปี แต่ละกลุ่มพบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) มีอายุเฉลี่ยขณะตั้งครรภ์เท่ากับ 27.06 ปี ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) มีอายุเฉลี่ย 26.97 ปี ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงอายุเฉลี่ยของกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปี ที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

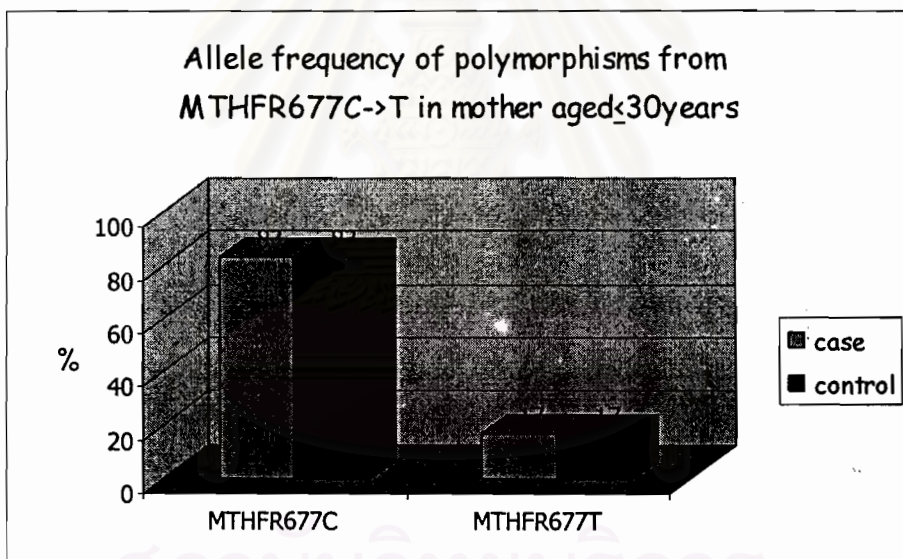
	Case (n = 32)	Control (n = 64)	Unpaired T test	P value
Age at conception ( X ± SD )	27.06 ± 3.09	26.97 ± 3.09	0.09	0.925

#### ความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึม (Allele frequency)

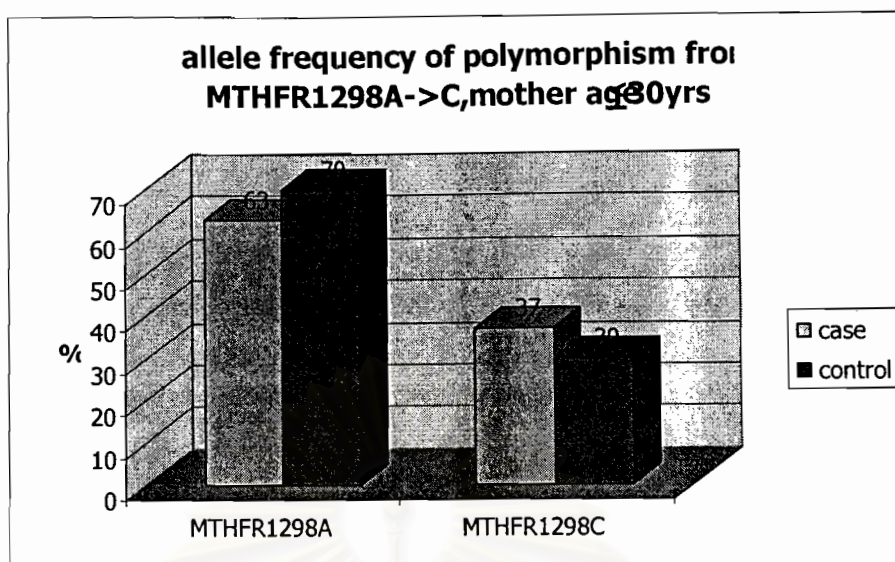
จากตัวอย่างเลือดที่ได้จากกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปี จำนวน 64 ราย ทั้ง 2 กลุ่ม นำมาหาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 แล้วนำมาวิเคราะห์หาความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆ พบว่าการกระจายของข้อมูลทั้ง 2 กลุ่มอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ของประชากรทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p=1.0$ ) และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของประชากรทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบกันพบว่าไม่แตกต่างกัน ( $p=0.328$ ) ดังแสดงใน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) ที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุ  $\geq 30$  ปี

Genotype	Allele	Case	Control	$\chi^2$	P value
		number(%)	number(%)		
MTHFR677	C	53 (83)	106(83)	0	1.0
	T	11(17)	22(17)		
MTHFR1298	A	40(63)	89(70)	0.957	0.328
	C	24(37)	39(30)		



แผนภูมิที่ 5 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) ที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุ  $\geq 30$  ปี



แผนภูมิที่ 6 แสดงความถี่ของ โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) ที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุ  $\geq 30$  ปี

ความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆกับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในกลุ่มมารดาอายุน้อยกว่า 30 ปี

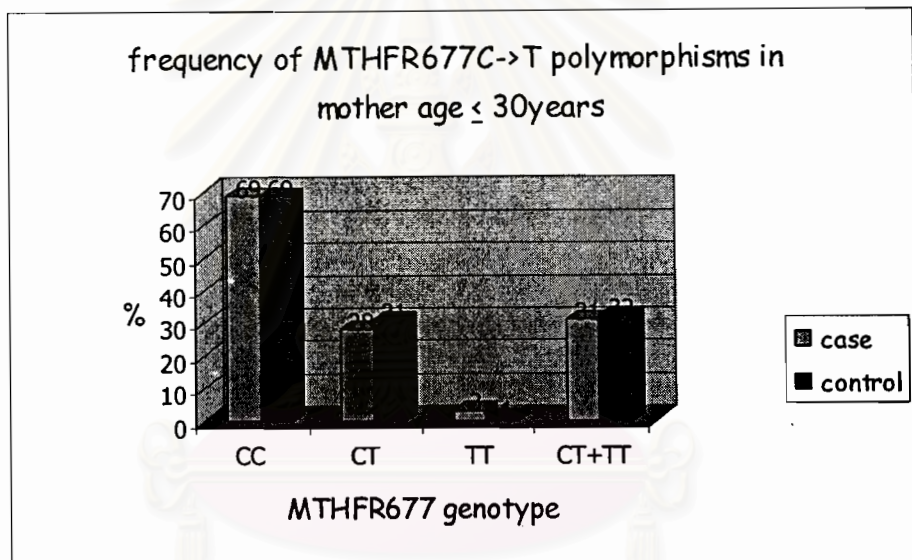
#### 1. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T

จากการวิเคราะห์และรวบรวมความถี่ของ โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ ได้แก่ CC, CT และ TT พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์จำนวน 32 คนมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 22 คน (69%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT จำนวน 9 คน (28%) และ โพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT จำนวน 1 คน (3%) ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 64 คน มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 43 คน (69%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT จำนวน 20 คน (31%) และ โพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT จำนวน 1 คน (1%)

เมื่อนำความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT และ TT มาเปรียบเทียบกับความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติมาหาค่า Odd ratio ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T แบบ CT กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ แต่พบว่าเป็นกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปี และมีโพลิมอร์ฟิซึมของยีนเป็นแบบ TT มีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8, แผนภูมิที่ 7)

ตารางที่ 8 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่อายุน้อยกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนและกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 677 Genotype	Case n = 32 (%)	Control n = 64 (%)	Odd ratio (95%CI)
	CC	22 (69)	
CT	9 (28)	20 (31)	0.86 (0.3-2.4)
TT	1 (3)	1 (1)	2.03 (0.00-77.44*)
CT+TT	10 (31)	21 (32)	0.93 (0.34-2.54)



แผนภูมิที่ 7 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาตั้งครรภ์ที่อายุน้อยกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวน (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

## 2. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

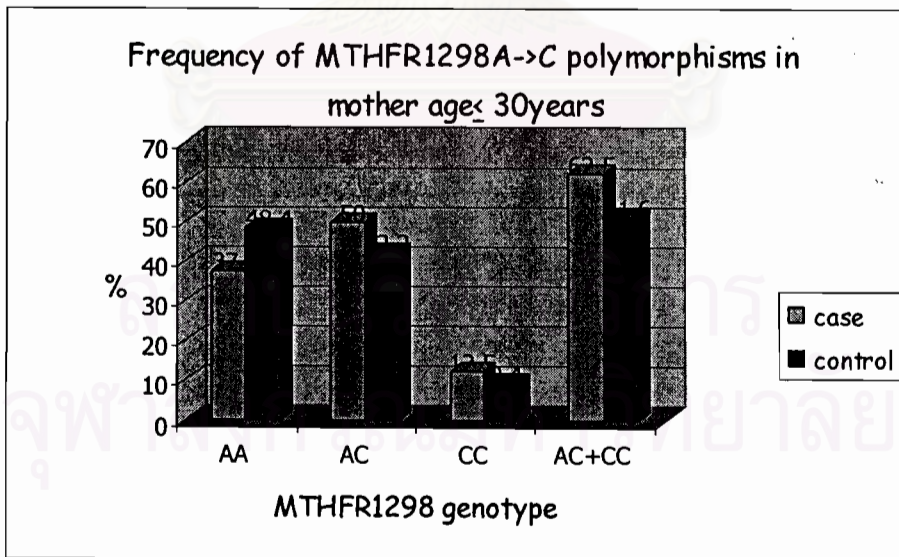
จากการวิเคราะห์และรวบรวมความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่ตั้งมีบุตรครรภ์ที่อายุน้อยกว่า 30 ปีเป็นกลุ่มอาการคาวนและกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ ได้แก่ AA, AC และ CC พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวน



จำนวน 32 คนมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA จำนวน 12 คน (37.5%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC จำนวน 16 คน (50%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 4 คน (12.5%) ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 64 คน มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA จำนวน 31 คน (48.4%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC จำนวน 27 คน (42.2%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 6 คน (9.4%)

เมื่อนำความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC และ CC มาเปรียบเทียบกับความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติมาหาค่า Odd ratio ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติพบว่า มีความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง จาก 1298 จาก A เป็น C (AC, CC, AC+CC) กับโอกาสที่มารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า 30 ปีจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9, แผนภูมิที่ 8) ตารางที่ 9 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 1298 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95%CI)
	n = 32 (%)	n = 64 (%)	
AA	12 (37.5)	31 (48.4)	Reference
AC	16 (50)	27 (42.2)	1.37 (0.54-3.51)
CC	4 (12.5)	6 (9.4)	1.79 (0.43-7.45)
AC+CC	21 (62.5)	33 (51.6)	1.79 (0.68- 4.75)



แผนภูมิที่ 6 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

### 3. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677จากC เป็น Tและที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

เมื่อนำความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677จากC เป็น Tและที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C มารวมกันและนำมาหาความสัมพันธ์กับโอกาสที่กลุ่มมารดาตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า30 ปีมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์พบว่า ความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 หรือ 1298แบบ CC/CC, CT/AA, CT/AC, CT/CC, TT/ACและTT/CCเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโพลิมอร์ฟิซึมแบบCC/AAซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ แต่โพลิมอร์ฟิซึมแบบCC/ACและ TT/AA พบว่ามีความสัมพันธ์กับการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่10)

ตารางที่10แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 677/1298 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95%CI)
	n = 32(%)	n = 64(%)	
CC/AA	6 (19)	19 (30)	Reference
CC/AC	13 (41)	18 (28)	1.75 (0.60-1.73)
CC/CC	3 (9)	6 (9)	1.00 (0.18-4.99)
CT/AA	5 (16)	11(17)	0.89 (0.24-3.18)
CT/AC	3 (9)	9(14)	0.63 (0.12-2.55)
CT/CC	1(3)	No	ND
TT/AA	1(3)	1(2)	2.03 (0.0-77.44*)
TT/AC	No	No	ND
TT/CC	No	No	ND

No = not observed, ND = not determined , Ref.= Reference category

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 กับโอกาสเกิดบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในมารดาที่อายุมากกว่า 30 ปี

#### กลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา (Study population)

จากการรวบรวมตัวอย่างเลือดของกลุ่มมารดาไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) รวมทั้งหมด 109 คน มีมารดาที่มีอายุขณะตั้งครรภ์มากกว่า 30 ปี จำนวน 77 ราย และตัวอย่างเลือดจากกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่แผนกสูติรีเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (control) จำนวน 186 คน มีมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปี จำนวน 121 ราย

เมื่อทำการวิเคราะห์หาอายุเฉลี่ยของประชากรที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า 30 ปี แต่ละกลุ่มพบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) มีอายุเฉลี่ยขณะตั้งครรภ์เท่ากับ 36.7 ปี ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) มีอายุเฉลี่ย 35.24 ปี ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่าง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 11 แสดงอายุเฉลี่ยของกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า 30 ปี ที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

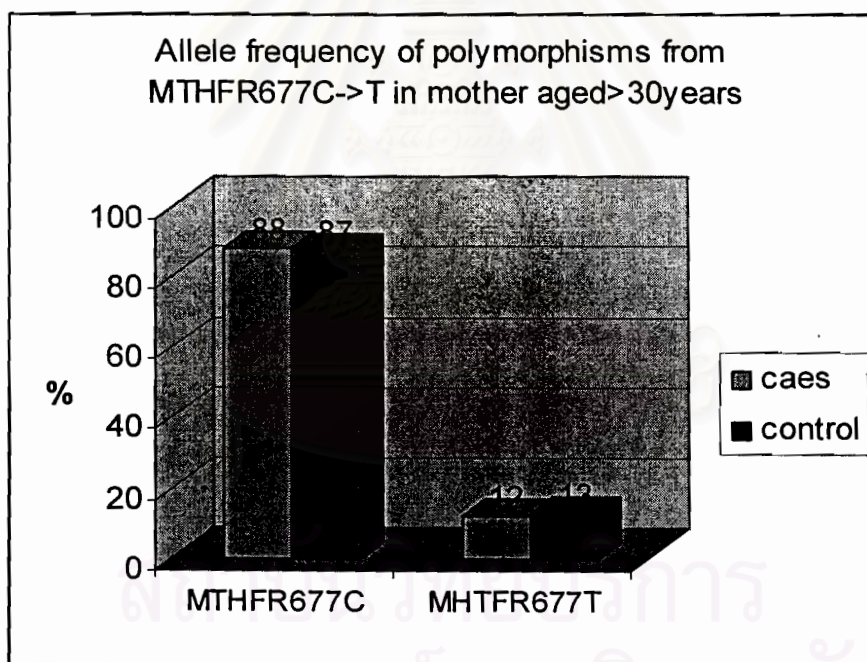
	Case (n = 77)	Control (n = 121)	Unpaired T test	P value
Age at conception ( X ± SD )	36.7	35.24	0	1.00

#### ความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึม (Allele frequency)

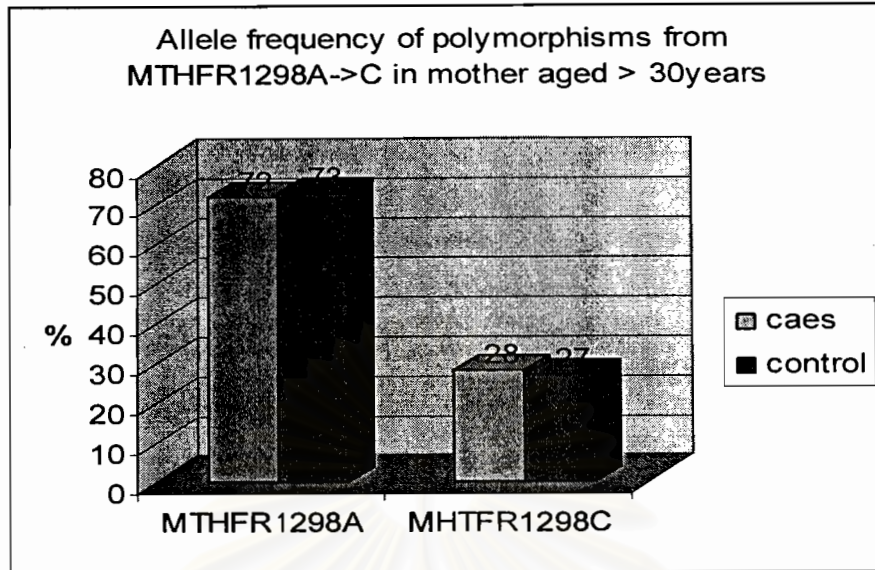
จากตัวอย่างเลือดที่ได้จากกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า 30 ปี จำนวน 198 ราย ทั้ง 2 กลุ่ม นำมาหาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 แล้วนำมาวิเคราะห์หาความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆ พบว่าการกระจายของข้อมูลทั้ง 2 กลุ่มอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ของประชากรทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $p=0.943$ ) และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของประชากรทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบกันพบว่าไม่แตกต่างกัน ( $p=0.988$ ) ดังแสดงใน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 12 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T และความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ของกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) ที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุ>30ปี

Genotype	Allele	Case	Control	$\chi^2$	P value
		number(%)	number(%)		
MTHFR677	C	135(87)	212(87)	0.01	0.943
	T	19(13)	32(13)		
MTHFR1298	A	111(73)	177(73)	0.010	0.988
	C	43(27)	67(27)		



แผนภูมิที่ 9 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) ที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุ>30ปี



แผนภูมิที่10 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) ที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุ>30ปี

ความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมแบบต่างๆกับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ในกลุ่มมารดาอายุมากกว่า 30 ปี

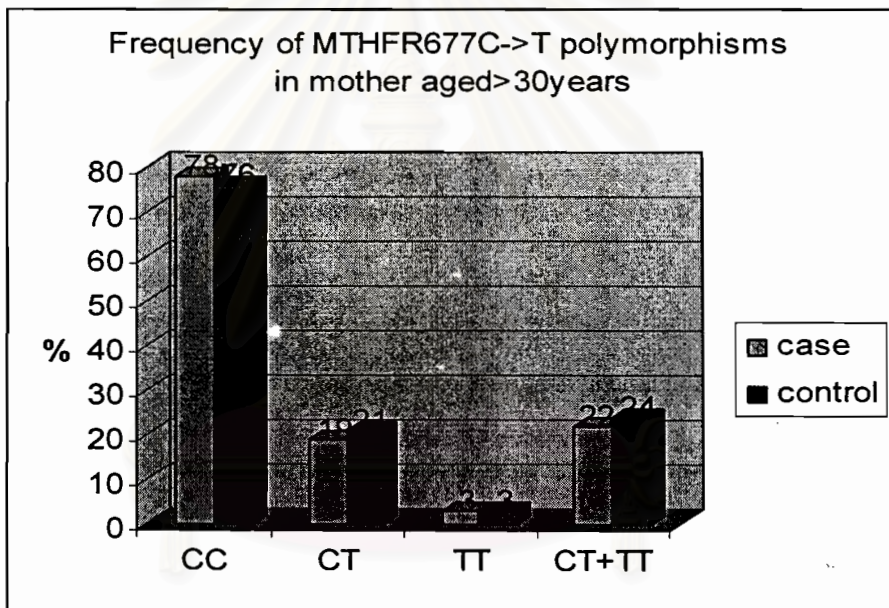
#### 1. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T

จากการวิเคราะห์และรวบรวมความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ ได้แก่ CC, CT และ TT พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์จำนวน 77 คนมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 60 คน (78%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT จำนวน 15 คน (19%) และ โพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT จำนวน 2 คน (3%) ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 122 คน มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 62 คน (76%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT จำนวน 53 คน (21%) และ โพลิมอร์ฟิซึมแบบ TT จำนวน 7 คน (3%)

เมื่อนำความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CT และ TT มาเปรียบเทียบกับความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติมาหาค่า Odd ratio ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T กับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (ตารางที่ 13, แผนภูมิที่ 11)

ตารางที่ 8 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ที่อายุมากกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 677 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95%CI)
	n = 77 (%)	n = 122 (%)	
CC	60 (78)	62 (76)	Reference
CT	15 (19)	53 (21)	0.29 (0.14- 0.60)
TT	2 (3)	7 (3)	0.30 (0.04-1.65)
CT+TT	17 (22)	60 (24)	0.29 (0.15-0.58)



แผนภูมิที่ 7 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 จาก C เป็น T ในกลุ่มมารดาตั้งครรภ์ที่อายุมากกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control)

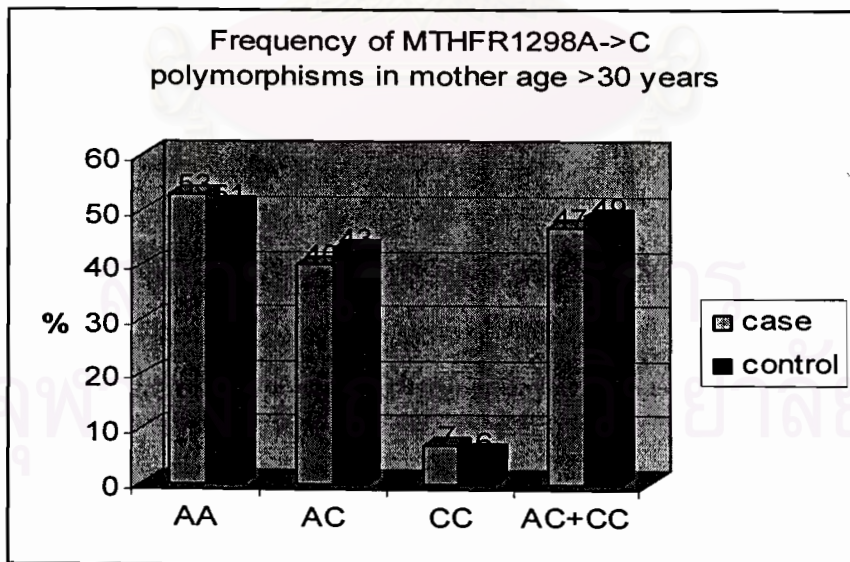
## 2. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

จากการวิเคราะห์และรวบรวมความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ที่อายุมากกว่า 30 ปีเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดา

ที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ ได้แก่ AA, AC และ CC พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ จำนวน 77 คนมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA จำนวน 41 คน (53%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC จำนวน 31 คน (40%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 5 คน (7%) ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติจำนวน 122 คน มีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA จำนวน 62 คน (51%) โพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC จำนวน 53 คน (43%) และโพลิมอร์ฟิซึมแบบ CC จำนวน 7 คน (6%)

เมื่อนำความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AC และ CC มาเปรียบเทียบกับความถี่ของการมีโพลิมอร์ฟิซึมแบบ AA ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติมาหาค่า Odd ratio ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการกลายโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C (AC, CC, AC+CC) กับโอกาสที่มารดาที่ตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า 30 ปีจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (ตารางที่ 14, แผนภูมิที่ 12) ตารางที่ 14 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

MTHFR 1298 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95%CI)
	n = 77 (%)	n = 122 (%)	
AA	41 (53)	62 (51)	Reference
AC	31 (40)	53 (43)	0.88(0.47-1.67)
CC	5 (7)	7 (6)	1.12 (0.31-4.10)
AC+CC	36 (47)	60 (49)	1.19 (0.65- 2.21)



แผนภูมิที่ 6 แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C ในกลุ่มมารดาตั้งครรภ์เมื่ออายุมากกว่า 30 ปีที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติในแบบต่างๆ

3. โพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677จากC เป็น Tและที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C

เมื่อนำความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677จากC เป็น Tและที่ตำแหน่ง 1298 จาก A เป็น C มารวมกันและนำมาหาความสัมพันธ์กับโอกาสที่กลุ่มมารดาตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อยกว่า30 ปีมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์พบว่า ความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 หรือ 1298แบบ CC/CC, CT/AA, CT/AC, CT/CC, TT/AA, TT/ACและTT/CCเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ โพลิมอร์ฟิซึมแบบCC/AAซึ่งเป็น โพลิมอร์ฟิซึมของคนปกติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับโอกาสเกิดบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ แต่โพลิมอร์ฟิซึมแบบCC/ACพบว่ามีความสัมพันธ์กับการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่15)

ตารางที่15แสดงความถี่ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MTHFRในกลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ และกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า30ปีในแบบต่างๆ

MTHFR 677/1298 Genotype	Case	Control	Odd ratio (95%CI)
	n = 77(%)	n = 122(%)	
CC/AA	31 (40)	40 (32)	Reference
CC/AC	25 (32)	46 (38)	0.701 (0.34-1.46)
CC/CC	4 (5)	7 (6)	0.737 (0.16-3.17)
CT/AA	8 (11)	19(16)	0.543 (0.19-1.54)
CT/AC	6 (8)	7(6)	1.105 (0.29-4.17)
CT/CC	1 (1)	No	ND
TT/AA	2 (3)	3(2)	0.860 (0.09-6.91)
TT/AC	No	No	ND
TT/CC	No	No	ND

No = not observed, ND = not determined , Ref.= Reference category



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

กลุ่มอาการดาวน์เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมที่พบบ่อยที่สุด โดยพบว่าสาเหตุทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการดาวน์ส่วนใหญ่เกิดจากการที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 โครโมโซม (95% Trisomy 21, 4% Chromosome translocation, 1% Mosaicism) และโครโมโซมที่เกินมาเป็นโครโมโซมจากมารดา 80% และจากบิดา 20% จากการศึกษาพบว่ากลไกการที่ทำให้เกิดโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินเกิดจากการไม่แยกตัวของโครโมโซมในระยะ meiosis I

ดังนั้น จึงมีการตั้งสมมติฐานว่าถ้าเกิดการกลายพันธุ์ของยีน Methylene tetrahydrofolate reductase ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของ Folate และ DNA methylation ทำให้มีการทำงานของเอนไซม์ลดลงเกิด DNA hypomethylation มีผลต่อการไม่แยกตัวของโครโมโซมและการเกิดไตรโซมี 21 ได้

คณะผู้วิจัยได้ทำการรวบรวมตัวอย่างเลือดของกลุ่มมารดาไทยที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) รวมทั้งหมด 109 คน โดยเป็นกลุ่มมารดาที่บุตรมารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และตัวอย่างเลือดจากกลุ่มมารดาที่มาฝากครรภ์ที่แผนกสูติรีเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (control) จำนวน 186 คน เมื่อทำการวิเคราะห์หาอายุโดยเฉลี่ยของประชากรแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (case) มีอายุเฉลี่ยขณะตั้งครรภ์เท่ากับ 32.4 ปี ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติ (control) มีอายุเฉลี่ย 33.9 ปีซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ( $p=0.85$ )

เมื่อทำการวิเคราะห์เพื่อหาความถี่ของอัลลีลต่างๆของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติเพื่อเทียบกับความถี่ของอัลลีลของประชากรไทยปกติพบว่าความถี่ของอัลลีล MTHFR677T เท่ากับ 15% ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วนความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่ง 1298C เท่ากับ 28% ซึ่งใกล้เคียงกับความถี่ของประชากรไทยที่เคยได้รับการศึกษามาก่อนเช่นกัน

และเมื่อนำความถี่ของยีน MTHFR677C และ MTHFR677T ของกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติเทียบกับมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ( $\chi^2=0.064, p=0.800$ ) เช่นเดียวกับความถี่ของอัลลีล MTHFR 1298A และ MTHFR1298C ( $\chi^2=0.333, p=0.564$ )

ผลของการศึกษาเพื่อหา genotype ของยีน MTHFR677C  $\rightarrow$  T ในประชากรทั้งสองกลุ่ม พบว่าความถี่ของ genotype แบบ CT และ TT ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมทำงานได้

ลดลงกว่าปกตินั้นเมื่อนำไปหาค่า Odds ratio โดยเทียบกับ genotype CC ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติ ในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติและมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กัน ส่วนผลของการศึกษาเพื่อหา genotype ของยีน MTHFR1298A  $\rightarrow$  C ในประชากรทั้งสองกลุ่ม พบว่า ความถี่ของ genotype แบบ AC และ CC เมื่อนำไปหาค่า Odd ratio โดยเทียบกับ genotype AA ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติและมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กัน

และเมื่อนำ genotype ของยีน MTHFR ทั้งสองตำแหน่งมารวมกันแล้วแจกแจงความถี่ของ genotype ในแต่ละแบบ พบว่าในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งสองกลุ่ม ไม่มี genotype แบบ TT/AC และ TT/CC เลย เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของ genotype แต่ละแบบกับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์โดยหาค่า Odd ratio เทียบกับ genotype CC/AA ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน

วิเคราะห์ดูความถี่ของยีนในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปีกลุ่ม พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์มีอายุเฉลี่ยขณะตั้งครรภ์เท่ากับ 27.06 ปี ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติมีอายุเฉลี่ย 26.97 ปีซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ( $p=0.925$ )

ทำการวิเคราะห์เพื่อหาความถี่ของอัลลีลต่างๆของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 ในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปีมีบุตรปกติเพื่อเทียบกับความถี่ของอัลลีลของประชากรไทยปกติพบว่า ความถี่ของอัลลีล MTHFR677T เท่ากับ 17% ส่วนความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่ง 1298C เท่ากับ 30% ซึ่งใกล้เคียงกับความถี่ของประชากรไทยที่เคยได้รับการศึกษามาก่อนเช่นกัน

และเมื่อนำความถี่ของยีน MTHFR677C และ MTHFR677T ของกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปีและมีบุตรปกติเทียบกับมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ( $\chi^2=0, p=1.0$ ) เช่นเดียวกับความถี่ของอัลลีล MTHFR 1298A และ MTHFR 1298C ( $\chi^2=0.957, p=0.328$ )

ผลของการศึกษากลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุน้อยกว่า 30 ปีเพื่อหา genotype ของยีน MTHFR677C  $\rightarrow$  T ในประชากรทั้งสองกลุ่ม พบว่าความถี่ของ genotype แบบ CT เมื่อนำไปหาค่า Odds ratio โดยเทียบกับ genotype CC ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติและมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ความถี่ของ genotype TT เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรตัวอย่างทั้งสองกลุ่มพบว่า Odds ratio มีค่าเท่ากับ 2.03 แสดงว่ามี genotype TT มีความสัมพันธ์กับการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (95% confidence interval = 0.00-77.44) ส่วนผลของการศึกษาเพื่อหา genotype ของยีน MTHFR1298A  $\rightarrow$  C ในประชากรทั้งสองกลุ่ม พบว่าความถี่ของ genotype แบบ AC และ CC เมื่อนำไปหาค่า Odds ratio โดยเทียบกับ genotype AA ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติและมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่ม

อาการคาวนั้นมีความสัมพันธ์กับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวทั้งสองแบบ (Odd ration=1.37 และ 1.79ตามลำดับ) แต่พบว่าไม่มีสำคัญทางสถิติ

และเมื่อนำ genotype ของยีน MTHFR ทั้งสองตำแหน่งมารวมกันแล้วแจกแจงความถี่ของ genotype ในแต่ละแบบ พบว่าในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งสองกลุ่มไม่มี genotype แบบ TT/AC และ TT/CC เลย เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของ genotype แต่ละแบบกับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนั้นโดยหาค่า Odd ration เทียบกับ genotype CC/AA ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติ พบว่า genotype แบบ CC/AC และ TT/AA มีความสัมพันธ์กับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนี้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

วิเคราะห์ดูความถี่ของยีนในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า 30 ปีกลุ่ม พบว่ากลุ่มมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนี้มีอายุเฉลี่ยขณะตั้งครรภ์เท่ากับ 36.7 ปี ส่วนกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติมีอายุเฉลี่ย 35.24 ปี

ทำการวิเคราะห์เพื่อหาความถี่ของอัลลีลต่างๆของยีน MTHFR ที่ตำแหน่ง 677 และที่ตำแหน่ง 1298 ในกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า 30 ปีมีบุตรปกติเพื่อเทียบกับความถี่ของอัลลีลของประชากรไทยปกติพบว่า ความถี่ของอัลลีล MTHFR 677T เท่ากับ 13% ส่วนความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่ง 1298C เท่ากับ 27% ซึ่งใกล้เคียงกับความถี่ของประชากรไทยที่เคยได้รับการศึกษามาก่อนเช่นกัน

และเมื่อนำความถี่ของยีน MTHFR 677C และ MTHFR 677T ของกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า 30 ปีและมีบุตรปกติเทียบกับมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ( $\chi^2=0.01, p=0.943$ ) เช่นเดียวกับความถี่ของอัลลีล MTHFR 1298A และ MTHFR 1298C ( $\chi^2=0.010, p=0.988$ )

ผลของการศึกษากลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ขณะอายุมากกว่า 30 ปีเพื่อหา genotype ของยีน MTHFR 677C  $\rightarrow$  T ในประชากรทั้งสองกลุ่ม พบว่า ไม่ว่าจะ เป็น genotype แบบใดเมื่อนำไปหาค่า Odds ratio โดยเทียบกับ genotype CC ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติและมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนั้น ไม่มีความสัมพันธ์กัน ส่วนผลของการศึกษาเพื่อหา genotype ของยีน MTHFR 1298A  $\rightarrow$  C ในประชากรทั้งสองกลุ่ม พบว่าความถี่ของ genotype แบบ AC เมื่อนำไปหาค่า Odds ratio โดยเทียบกับ genotype AA ซึ่งเป็น genotype ของคนปกติในกลุ่มมารดาที่มีบุตรปกติและมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนั้น ไม่มีความสัมพันธ์กับ โอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนี้ แต่ genotype แบบ CC นั้นมีความสัมพันธ์กับการมีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนี้ แต่พบว่าไม่มีสำคัญทางสถิติ (Odds ratio=1.12, 95% confidence interval 0.31-4.10)

และเมื่อนำ genotype ของยีน MTHFR ทั้งสองตำแหน่งมารวมกันแล้วแจกแจงความถี่ของ genotype ในแต่ละแบบ พบว่าเมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของ genotype แต่ละแบบกับโอกาสที่มารดาจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการคาวนี้โดยหาค่า Odds ratio เทียบกับ genotype CC/AA ซึ่งเป็น genotype

ของคนปกติ พบว่าgenotypeแบบCC/ACมีความสัมพันธ์กับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

#### ข้อเสนอแนะ

เมื่อนำผลจากการวิจัยข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ในส่วนของการกลายพันธุ์ของ โพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFR ที่ตำแหน่ง677และที่ตำแหน่ง1298นั้นยังไม่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการที่สตรีจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ถึงแม้จะพบว่าบาง genotypeจะพบว่ามีความสัมพันธ์กับโอกาสมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ (odds ratio>1) ก็ตาม ทั้งนี้อาจเกิดจากกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษาและที่มีgenotypeดังกล่าวมีจำนวนน้อยเกินไป ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาโดยใช้กลุ่มประชากรตัวอย่างที่มากขึ้น

นอกจากนี้การที่ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการที่สตรีจะมีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์ อาจเนื่องจากการที่จะเกิดการไม่แยกตัวของโครโมโซม (nondisjunction) ในมารดาที่มีบุตรเป็นกลุ่มอาการดาวน์นั้นเกิดตั้งแต่ขณะมารดาอยู่ในครรภ์ ดังนั้นอาจต้องทำการศึกษหาโพลิมอร์ฟิซึมของยีนMTHFRจากตัวอย่างเลือดของยายของผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ด้วย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### รายการอ้างอิง

1. Creasy, MR. and Polani, PE. High risk of Down's syndrome at advanced maternal age, Lancet 69(1978):683-684.
2. Hook, EB. Current difficulties in use of maternal serum alpha-fetoprotein levels in counseling mid-trimester older pregnant women regarding risk of a Down's syndrome fetus, Am J Med Genet 31(1988):247-250.
3. Ji, WZ., Hernandez, R. and Zhang, XY., et al. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of Chromosome, Mutat Res 379(1997):33-41.
4. Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. and Rozen, R. A second genetics polymorphism in Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity, Mol Genet Metab 64(1998):169-172.
5. James, SJ., Pogribna, M., Pogribny, IP., Melnyk, S., Hine, RJ. and Gibson, JB., et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down's syndrome, Am J Clin Nutr 70(1999):495-501.
6. Hobbs, CA., Sherman, SL., Yi, P., Hopkins, SE., Torf, CP. and Hine, RJ. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down's syndrome, Am J Hum Genet 67(2000):623-630.
7. Terry, J., Hassold, I., Lindsay, C., Burrage, J., Ernest, R. and James, J. et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction, Am J Hum Genet 69(2001): 434-439.
8. Valerie, O., Parle-McDermott, A., Molly, A., Kirke, P., Jonhson, Z., and Conley, M., et al. *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: link to Down Syndrome? Am J Med Genet 107(2002):151-155.
9. Chadeaux-Vekemans, B., Coude, M., Muller, F., Oury, J., Cali, A. and Kamoun, P. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down's syndrome. Pediatr Res 51(2002):766-767.
10. Stuppia, L., Gatta, V., Gaspari, A., Antonucci, I., Morizio, E. and Calabrese, G. et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and the risk of Down syndrome in Italy, Eur J Hum Genet 10(2002):388-390 .

11. Bosco, P., Gueant-Rodriguez, R., Anello, G., Barone, C., Namour, F. and Caraci, F. et al.

Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A->G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 121(2003):219-224.

12. Shotelersuk, V., Ittiwut, C., Siriwan, P. and Angspatt, A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip, *J Med Genet* 40(2003):1-4.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นางสาวรัชชวัญ อินทป็นดี
วัน เดือน ปีเกิด	27 มิถุนายน พ.ศ. 2520 กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	125/206 หมู่บ้านสายลม ปากเกร็ด นนทบุรี
การศึกษา	แพทยศาสตรบัณฑิต ( เกียรตินิยมอันดับ 2 )คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2542
การทำงาน	พ.ศ.2543-2544 นายแพทย์4 โรงพยาบาลเชียงคำ จังหวัดพะเยา พ.ศ.2544-2545 นายแพทย์4 โรงพยาบาลจอมทอง จ.เชียงใหม่ พ.ศ.2545-2546 นายแพทย์5 โรงพยาบาลสรรคบุรี จ.ชัยนาท พ.ศ.2546-ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย