

การตรวจหาการกลายพันธุ์บริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน SCN5A  
ในผู้ป่วยไหลตายที่มีลักษณะของกลุ่มอาการบรูคาดาด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี



นายเทพฤทธิ์ สงวนไทรพานิชกุล

# สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

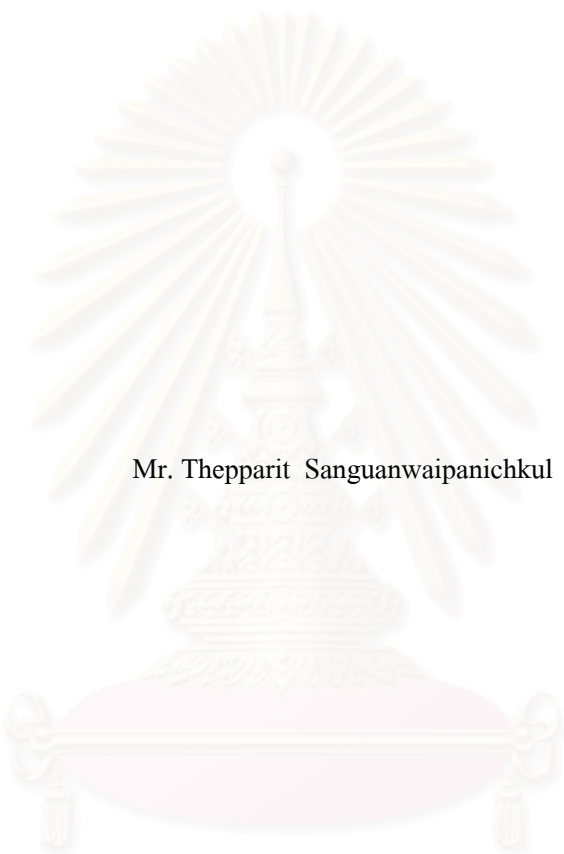
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2182-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF INTERSEGMENT REGIONS IN *SCN5A* GENE MUTATION IN SUDDEN  
UNEXPLAINED DEATH SYNDROME PATIENTS WITH BRUGADA SYNDROME BY  
SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) TECHNIQUE



Mr. Thepparit Sanguanwaipanichkul

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2182-6

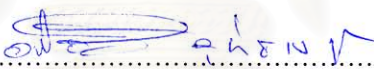
หัวข้อวิทยานิพนธ์                      การตรวจหาการกลายพันธุ์บริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน SCN5A ใน  
ผู้ป่วยไหลตายที่มีลักษณะของกลุ่มอาการbrugadaด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี  
โดย    นายเทพฤทธิ์ สงวนไพบานิชกุล  
สาขาวิชา                                      วิทยาศาสตร์การแพทย์  
อาจารย์ที่ปรึกษา                              ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์

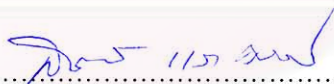
---


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณะบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์อิสรางค์ นุชประยูร)

เทพฤทธิ์ สงวนไวพานิชกุล : การตรวจหาการกลายพันธุ์บริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* ในผู้ป่วยไหลตายที่มีลักษณะของกลุ่มอาการbrugada ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี. (DETECTION OF INTERSEGMENT REGIONS IN *SCN5A* GENE MUTATION IN SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME PATIENTS WITH BRUGADA SYNDROME BY SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) TECHNIQUE)

อ. ที่ปรึกษา : ผศ.นพ. นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์, 68 หน้า. ISBN 974-14-2182-6.

ผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโรคไหลตาย หรือ Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) ส่วนใหญ่มีลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจเหมือนกับ Brugada syndrome คือ พบ right bundle branch block (RBBB) และ ST segment elevation ใน right chest leads

Brugada syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรม ถ่ายทอดแบบ autosomal dominant (โดยใช้ลักษณะการตายเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุในครอบครัว และคลื่นไฟฟ้าหัวใจเป็นพีโนไทป์) ยีนที่เป็นสาเหตุของ Brugada syndrome คาดว่าจะเป็นยีนที่สร้าง ion channel protein ต่าง ๆ ซึ่งประมาณ 15-30% ของผู้ป่วย Brugada syndrome มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* และมีหลายรายงานได้รายงานการกลายพันธุ์ซึ่งพบในบริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* มากกว่าบริเวณอื่น ๆ ดังนั้น จึงคาดว่าโรคไหลตายน่าจะมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ในบริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* ด้วย วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ในบริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* ในผู้รอดชีวิตจากไหลตายทั้งหมด 10 ราย โดยใช้วิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ตรวจสอบใน Exon ที่ 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 26 และ 28 ผลปรากฏว่า ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *SCN5A* ในบริเวณดังกล่าว พบเพียงแต่ polymorphism ใน exon ที่ 28 ช่วงที่ 3 ซึ่งวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) สามารถบ่งบอกรูปแบบของ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้เป็น 3 แบบ ซึ่งแต่ละแบบมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่แตกต่างกัน คือ TT, TC และ CC ดังนั้น วิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) อาจจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ในยีนอื่น ๆ ที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดไหลตายได้ในการศึกษาต่อไป

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....เทพฤทธิ์ สงวนไวพานิชกุล  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

## 4774732730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: INTERSEGMENT/ RIGHT BUNDLE BRANCH BLOCK/ ST-SEGMENT ELEVATION/  
BRUGADA SYNDROME/ SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME

THEPPARIT SANGUANWAIPANICHKUL : DETECTION OF INTERSEGMENT  
REGIONS IN *SCN5A* GENE MUTATION IN SUDDEN UNEXPLAINED DEATH  
SYNDROME PATIENTS WITH BRUGADA SYNDROME BY SINGLE STRAND  
CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) TECHNIQUE. THESIS ADVISOR :  
ASSIST.PROF. SOMKIAT SANGWATANAROJ, 68 pages. ISBN 974-14-2182-6.

Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) or Lai-Tai share the same ECG pattern as Brugada syndrome : right bundle branch block (RBBB) and ST segment elevation in right chest leads. Brugada syndrome is a genetic disorder with autosomal dominant inheritance (using sudden unexplained death in family members and the ECG pattern as phenotype) and 15-30% of Brugada syndrome associate with sodium channels : *SCN5A*. To determine whether SUDS survivors caused *SCN5A* mutation in intersegments region. The objective of study is to detect the intersegments region in *SCN5A* gene mutation in 10 Sudden Unexplained Death Syndrome survivors by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique in exon 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 26 and 28. We did not find any mutation in *SCN5A* but find a polymorphism in section 3 of exon 28. The Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique can separate 3 DNA bands of different polymorphism : TT, TC and CC. Therefore Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique may be used to detect mutation in other candidate genes of Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) in the further study.

Department Medical Science  
Academic year 2005

Student's signature.....*Thepparit Sanguanwaipanichkul*  
Advisor's signature.....*Somkiat Sangwatanaroj*

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช ของรองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2548

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง วิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย อีกทั้งยังให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย พร้อมกันนี้ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ และรองศาสตราจารย์นายแพทย์อิศรางค์ นุชประยูรที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนบรรลุวัตถุประสงค์ในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้โอกาสในการศึกษาหาความรู้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณจวีร์รัตน์ โพธิ์แก้ว ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และพี่ ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการมะเร็ง ชั้น 4 ตึกว่องวานิช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ กำลังใจ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจิรภา บุรีวงษ์ ที่คอยช่วยเหลือ ห่วงใย และให้กำลังใจในทุก ๆ ด้านเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ ทุกคนที่เป็นกำลังใจมาตั้งแต่เริ่มงานวิจัยจนสำเร็จ

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question).....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	2
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.9 ขั้นตอนการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ลักษณะอาการทางคลินิกของไหลตาย.....	6
2.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคไหลตาย.....	8
2.3 Brugada syndrome คืออะไร.....	10
2.4 การตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	17
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
3.1 รูปแบบการวิจัย.....	22
3.2 ประชากรศึกษา.....	22
3.3 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	23
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	34

	หน้า
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	35
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
4.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน <i>SCN5A</i> โดย SSCP.....	36
4.2 การหาลำดับเบส (Sequencing).....	52
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	54
5.1 ผลการเปรียบเทียบ.....	54
5.2 ผลการวิเคราะห์ปัจจัย.....	55
5.3 อภิปรายผลการวิจัย.....	55
5.4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	56
รายการอ้างอิง.....	57
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	68

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดง primers ของแต่ละ exon ที่ใช้ในการศึกษา.....	27
2. แสดงอัตราส่วนของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR.....	28
3. แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 1, 2, 3 และ8.....	29
4. แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 11, 12-1, 12-2 และ13.....	30
5. แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 17-1, 17-2, 18 และ19.....	31
6. แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 26, 28-3, 28-4 และ28-5.....	32



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1 แสดงจำนวน exon ทั้งหมด 28 exons ของยีน <i>SCN5A</i> .....	12
2 แสดง $\alpha$ และ $\beta$ subunit ของ sodium channel.....	12
3 แสดงถึงศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ในระยะต่าง ๆ.....	16
4 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งที่ถูกรายงานโดย Nimura H และคณะ.....	19
5 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ในหลาย ๆ ตำแหน่งที่เคยถูกรายงานไว้.....	21
6 แสดงรูปแบบของ ECG ของ Brugada syndrome.....	22
7 แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ในการติด lead เพื่อทำการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ.....	23
8 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 1 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP.....	36
9 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 2 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP.....	37
10 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 3 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP.....	38
11 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 8 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	39
12 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 11 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	40
13 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 12-1 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	41
14 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 12-2 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	42
15 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 13 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	43
16 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 17-1 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	44
17 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 17-2 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	45

18	แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 18 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	46
19	แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 19 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	47
20	แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 26 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	48
21	แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 28-3 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	49
22	แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 28-4 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	50
23	แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 28-5 ในยีน <i>SCN5A</i> ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP .....	51
24	แสดงลำดับเบสของคนปกติ (N1) ของ exon 28 ช่วงที่ 3.....	52
25	แสดงลำดับเบสของคนี่รอดตายจากโหลตาย (C5) ของ exon 28 ช่วงที่ 3.....	52
26	แสดงลำดับเบสของคนี่รอดตายจากโหลตาย (C6) ของ exon 28 ช่วงที่ 3.....	53
27	แสดงผลการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 แบบกับลำดับเบส.....	54

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

SUDS = Sudden Unexplained Death Syndrome

RBBB = Right Bundle Branch Block

PCR = Polymerase Chain Reaction

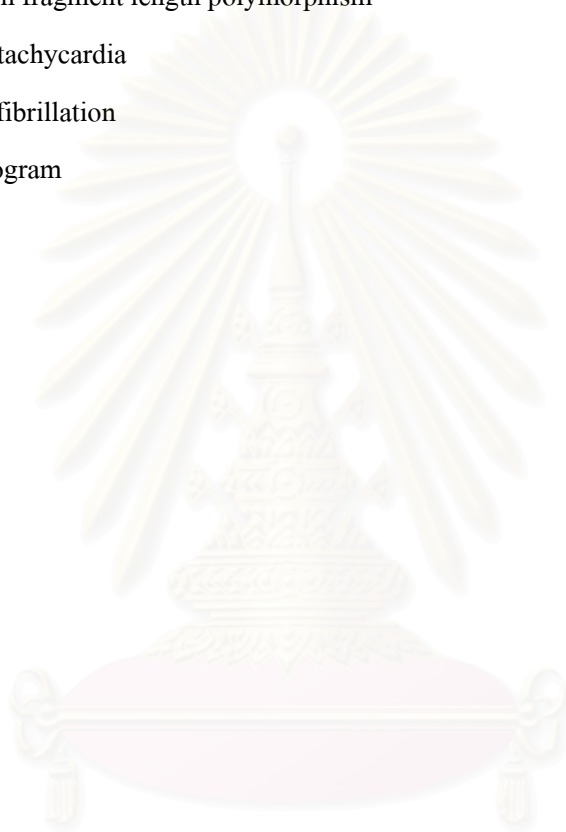
SSCP = Single Strand Conformation Polymorphism

RFLP = Restriction fragment length polymorphism

VT = Ventricular tachycardia

VF = Ventricular fibrillation

ECG = echocardiogram



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไหลตาย หรือ SUDS (Sudden Unexplained Death Syndrome) จัดได้ว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขหนึ่งที่ตั้งรกรากปัญหาทางเศรษฐกิจและความเสียหายให้กับครอบครัวของผู้เสียชีวิตได้มากพอควร เนื่องจากผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้นี้มักเป็นผู้ชายในวัยทำงาน และมักจะเป็นกำลังหลักของครอบครัว ซึ่งมีอายุในช่วงอายุ 20-49 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวมาก่อน เสียชีวิตอย่างกะทันหันในขณะที่พักผ่อนหรือนอนหลับ โดยเฉพาะในกลุ่มประชากรที่มีภูมิสำเนาเดิมในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และจากผลการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติใดที่อธิบายถึงสาเหตุการตายได้ จากการศึกษาอุบัติการณ์การเกิดโรคไหลตายในประเทศไทย พบว่าโรคนี้อุบัติการณ์ของการเกิดโรคประมาณ 20.8-38 คนต่อประชากรแสนคน[1-4] โดยถ้าเทียบอัตราการตายด้วยโรคไหลตายในประชากรไทยกับอัตราการตายด้วยโรคต่าง ๆ ของประชากรไทยในกลุ่มอายุ 20-49 ปี พบว่า โรคไหลตายอยู่ในอันดับที่ 4 ของสาเหตุการตายของประชากรในวัยนี้[5] ปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องมีได้หลายประการ เช่น การขาดวิตามินบี 1 [3] ภาวะความเครียด[6] ภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ[7] และปัจจัยทางพันธุกรรม[8-10] จากผลการตรวจทางพยาธิวิทยาที่ไม่พบความผิดปกติใดที่อธิบายถึงสาเหตุการตายได้ พบแต่เพียงว่าผู้ป่วยที่รอดตายจากไหลตายส่วนใหญ่ มีลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติเหมือนกับกลุ่มอาการการเสียชีวิตเฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุในประเทศตะวันตกที่เรียกว่า “กลุ่มอาการบรูกาดา (Brugada Syndrome)” ซึ่งมีลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจเป็นแบบ Right Bundle Branch Block และ ST-segment elevation ใน Lead V<sub>1</sub>-V<sub>3</sub>[11-12] และนำไปสู่การเต้นของหัวใจที่ผิดปกติอย่างรุนแรงแบบ ventricular fibrillation[13-15] จนเกิดอาการเป็นลมหมดสติ และ เสียชีวิตได้ จากการศึกษาทางพันธุกรรมของกลุ่มอาการบรูกาดาก่อนหน้านี้พบว่าเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการทำงานของ ion channel ที่หัวใจ คือ SCN5A[16-22] (cardiac sodium channel) บนโครโมโซมคู่ที่ 3 ตำแหน่ง 3p22-25 โดยมีรายงานพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้หลายสิบตำแหน่ง[23-28]

จากการศึกษาใน SCN5A ในผู้ที่รอดตายจากไหลตาย (Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome) ที่มีลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบกลุ่มอาการบรูกาดา 10 ราย พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ยีนนี้ 3 ราย[19] แสดงว่าโรคไหลตายน่าเป็นโรคเดียวกับกลุ่มอาการบรูกาดา ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาถึงการกลายพันธุ์ในยีนนี้เพิ่มเติมในคนไทยที่รอดชีวิตจากไหลตายที่มีลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบกลุ่มอาการบรูกาดา โดยจะเน้นการศึกษาหาการกลายพันธุ์บริเวณอินเตอร์

เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้เกือบทั้งหมดพบที่บริเวณนี้มากกว่าบริเวณอื่น[43] คาดว่าประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษาครั้งนี้ คือ ทราบว่าการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในตำแหน่งใดบ้างในบริเวณ อินเตอร์เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* และสามารถนำไปใช้เป็นการวินิจฉัยโรคในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคไหลตายได้ รวมทั้งอาจนำไปสู่การป้องกันและการรักษาโรคไหลตายได้ในอนาคตต่อไป

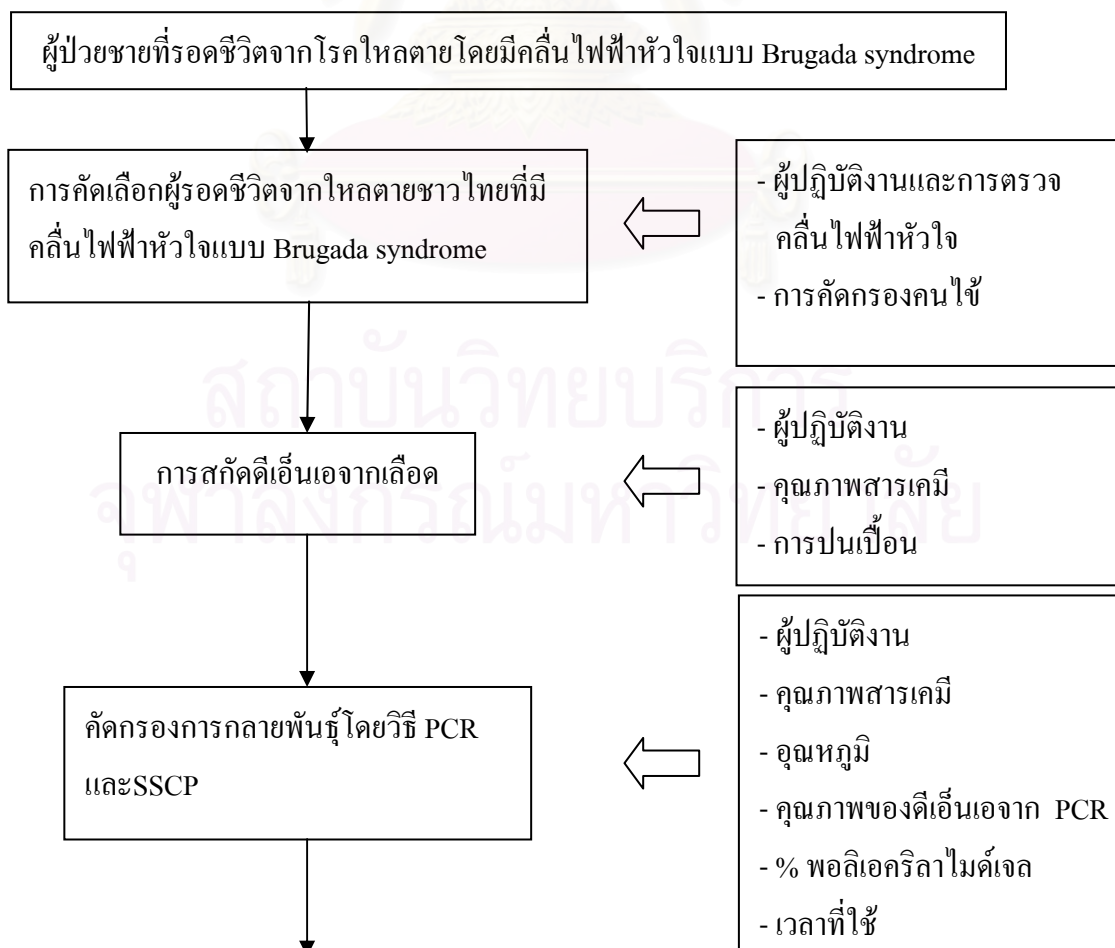
### 1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question)

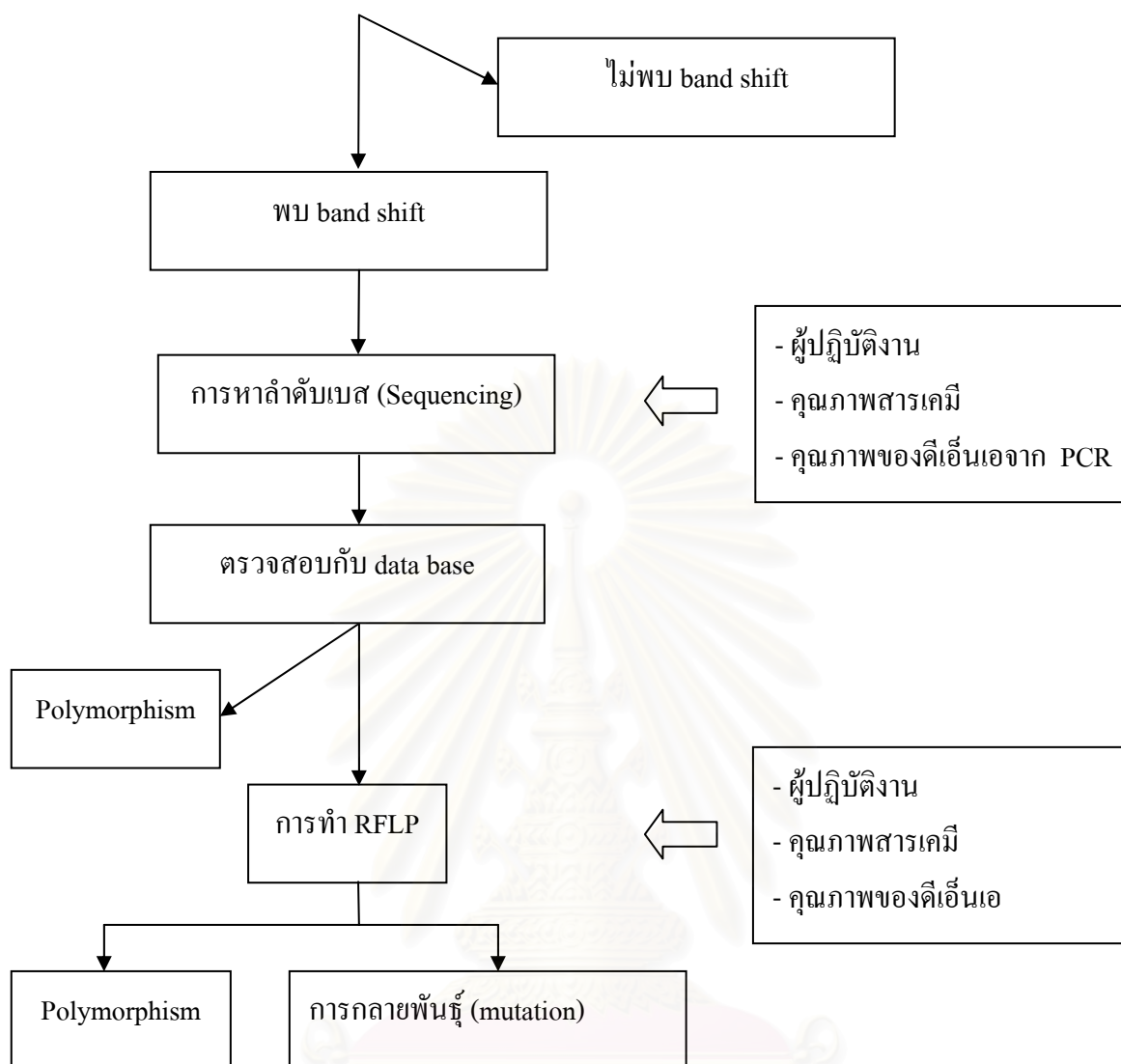
ผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโรคไหลตายโดยมีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada syndrome มีการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* บริเวณอินเตอร์เซกเมนต์หรือไม่ และเกิดขึ้นในตำแหน่งใดบ้าง

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* บริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ในผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโรคไหลตายที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Right Bundle Branch Block และ ST-segment elevation ใน right chest leads

### 1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย





### 1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1. ในการทำวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาในผู้ป่วยชายไทยที่รอดชีวิตจากไหลตายที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Right Bundle Branch Block และ ST-segment elevation ใน right chest leads จำนวนทั้งสิ้น 10 ราย

2. ทำการศึกษาเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* gene โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบหาความแตกต่างที่เกิดขึ้นใน *SCN5A* gene ด้วยเทคนิค SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) และหาลำดับเบสของผู้ป่วยเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับคนปกติ

## 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

การคัดเลือกผู้ป่วยจะทำการคัดเลือกผู้ป่วยที่รอดตายจากโรคไหลตาย และลักษณะของคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่เป็นแบบ Right Bundle Branch Block และ ST-segment elevation ใน right chest leads (Brugada syndrome) ถ้าผู้ป่วยมีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบดังกล่าวในลักษณะไม่ชัดเจนจะให้รับประทานยา Flecainide เพื่อกระตุ้นให้เห็นชัดเจนและทำการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจซ้ำ ถ้าไม่ปรากฏคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ ST-segment elevation จะทำการคัดออก

## 1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- ผู้รอดชีวิตจากโรคไหลตาย คือ ผู้ที่มีอายุอยู่ในช่วง 20-50 ปี เกิดอาการขณะนอนหลับหรือพักผ่อน มีสุขภาพแข็งแรงก่อนหน้านี้ที่จะเกิดอาการ มีอาการหายใจลำบาก ไม่มีสาเหตุของโรคทางหัวใจที่ทำให้หมดสติ และมีการตรวจพบคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada syndrome

- คลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada syndrome คือ right bundle branch block (RBBB) และ ST-segment elevation ใน right chest leads

- Mutation คือ การกลายพันธุ์ การเปลี่ยนแปลง การหาย การเพิ่ม การเรียงลำดับใหม่ของเบสในกรดนิวคลีอิก ซึ่งอาจทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเปลี่ยนไป หรือสูญเสียความสามารถในการผลิตโปรตีน ถ้าเกิดในเซลล์สืบพันธุ์ (germinal or germ line mutation) สามารถถ่ายทอดไปยังชั่วรุ่นต่อไปได้ แต่ถ้าเกิดในเซลล์ร่างกาย (somatic mutation) ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังชั่วรุ่นต่อไปได้ แต่สามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ของเซลล์นี้ต่อไป (daughter cell)

- Polymorphism คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม การมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกัน 2 ลักษณะ หรือมากกว่าในประชากร ซึ่งเกิดจากการมีแอลลีลต่างกัน จะถือว่า ยีนที่ตำแหน่งหนึ่งมีความหลากหลาย เมื่อความถี่ของแอลลีลที่มีน้อย ไม่ต่ำกว่า 0.01 หรือ 1 เปอร์เซ็นต์

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการยืนยันว่าโรคไหลตายมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน ทำให้ทราบกลไกการเกิดโรคไหลตาย

2. สามารถพัฒนาไปสู่การตรวจวินิจฉัยหาโรคไหลตายในผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยงได้

3. นำไปใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันการเกิดโรคไหลตายและนำไปสู่การรักษาได้ในอนาคต



## 1.9 ขั้นตอนการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่าง (Sample Collection)

คัดเลือกผู้ที่รอดชีวิตจากโศกนาฏกรรมที่โรงพยาบาลจุฬาฯ และมีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada syndrome คือ Right Bundle Branch Block (RBBB) และ ST-segment elevation ใน right chest leads ทั้งสิ้น 10 ราย

การคัดเลือกออก คือ ผู้ที่ไม่ให้ความร่วมมือในการวิจัย

### 2. ขั้นตอนการศึกษา (Process of study)

2.1 DNA Extraction

2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.3 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

2.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

### 3. รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผล (Data collection and analysis)

ตรวจว่าตำแหน่งที่มีลำดับเบสเปลี่ยนไปนั้นเป็น mutation หรือ polymorphism

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

โรคไหลตาย คือโรคที่มีการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันในคนวัยทำงาน และเกือบทั้งหมดเกิดกับผู้ชายที่แข็งแรง และไม่มีโรคประจำตัว อายุอยู่ระหว่าง 20 -49 ปี ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างนอนหลับ หรือขณะกำลังพักผ่อน โดยที่ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติอื่นใดที่อธิบายสาเหตุการตายได้ [2, 3, 29, 30]

#### 2.1 ลักษณะอาการทางคลินิกของโรคไหลตาย [5]

##### 2.1.1 โรคไหลตายครั้งแรก

สามารถแบ่งลักษณะอาการทางคลินิกของโรคไหลตายออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

##### 2.1.1.1 ลักษณะอาการก่อนตาย อาจแบ่งได้เป็น

- 1) ไม่มีอาการที่แสดงถึงความผิดปกติในขณะที่ทำงานและชีวิตประจำวัน ไม่มี ความผิดปกติแต่อย่างใด
- 2) อาจมีอาการเจ็บป่วยเล็กน้อยในช่วง 1-2 สัปดาห์ก่อนตาย เช่น มีอาการไข้ ปวดท้อง หายใจไม่อึด ปวดขา ปวดเอว ปวดศีรษะ หงุดหงิด เหนื่อยเพลีย นอนไม่หลับ หรือท้องอืด ซึ่งเป็นอาการไม่เฉพาะสำหรับโรคไหลตาย

##### 2.1.1.2 อาการแสดงขณะเกิดไหลตาย

แบ่งลักษณะอาการนี้ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของการเกิดอาการ ตามช่วงเวลาการมี หรือไม่มีผู้เห็นเหตุการณ์ ดังนี้

- 1) กลุ่มที่ตายโดยไม่มีผู้เห็นเหตุการณ์ ไม่สามารถทราบได้ว่ามีอาการหรือไม่ ญาติพบภายหลังว่าผู้ตายได้ตายแล้วในขณะที่นอน กลุ่มนี้อาจเป็นกลุ่มที่ไม่มีอาการชัดเจนพอ หรือขณะมีอาการ ไม่เป็นที่คิดสังเกตุของญาติ

##### 2) กลุ่มที่มีผู้เห็นเหตุการณ์ แบ่งได้ 2 กลุ่มคือ

- 1) กลุ่มที่ญาติเห็นเหตุการณ์ตั้งแต่เริ่มต้น ประมาณร้อยละ 10-16 ของไหลตาย เกิดเหตุการณ์ขณะนอนหรือนั่งพักผ่อน ในเวลากลางวัน เช่น กำลังสนทนา ดูโทรทัศน์ ฟังวิทยุ

- 2) กลุ่มที่ญาติเห็นเหตุการณ์ ซึ่งในกรณีนี้จะได้ประวัติเกี่ยวกับลักษณะอาการคือ มีเสียงดังในคอ เหมือนมีอาการหายใจลำบาก หายใจขัดหรือมีอาการเหมือนสำลัก หายใจไม่ทัน โดยไม่มีเสียงหวีดหวิว แต่จะเป็นเหมือนมีเสมหะติดคอ บางรายมีเสียงกรีดร้อง

เหมือนมีการฝันร้ายหรือละเมอ นอกจากนี้ยังมีอาการเกร็งตัว ท้องแข็ง กำมือแน่น มีน้ำลายฟูมปาก บางรายมีปัสสาวะร่วมด้วย ทุกๆรายจะได้ประวัติของการปลุกตื่นลำบาก ในระยะที่ปลุกตื่นได้ญาติ ต้องใช้ความพยายามหลายอย่างเพื่อให้ผู้ที่ เป็นโหลตายรู้สึกเจ็บแล้วตื่นขึ้นมา

ผู้ที่มีอาการแล้วถูกปลุกขึ้นมาได้ จะให้ประวัติเกี่ยวกับการมีปัญหของการหายใจ เช่น รู้สึกเหมือนทางเดินหายใจอุดตัน มีความรู้สึกเหมือนถูกกดทับที่หน้าอก ทำให้หายใจลำบาก หรือมีอาการมึน ซา อ่อนแรง ในกรณีที่ปลุกไม่ตื่นส่วนใหญ่จะเสียชีวิตภายใน 30 นาที และมากกว่าร้อยละ 90 จะตายภายในเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เริ่มมีอาการ

### 2.1.2 โหลตายซ้ำ

ผู้ที่รอดตายจากอาการโหลตายเหล่านี้บางรายจะตายในเวลาต่อมาภายหลังล้มตัวลงนอนอีกครั้ง หรือระหว่างเดินทางไปโรงพยาบาลในคืนเดียวกัน หรือในเวลาหลายชั่วโมงต่อมา การเกิดโหลตายยังอาจเกิดซ้ำได้อีกในระยะเป็นเดือนหรือปีภายหลังจากอาการครั้งแรก เนื่องจากอาการขณะเกิดโหลตายมีลักษณะคล้ายอาการชักของโรคลมบ้าหมู ทำให้ญาติหรือเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทางการแพทย์เข้าใจผิด จึงเป็นสาเหตุให้ผู้ที่เกี่ยวข้องที่จะเกิดโหลตายซ้ำเหล่านี้ไม่ได้รับการตรวจรักษาที่เหมาะสมและตายในระยะเวลาต่อมา

### 2.1.3 สิ่งที่ต้องตรวจพบก่อนเสียชีวิต

เนื่องจากผู้ที่เป็นโหลตายทุกรายไม่มีปัญหาสุขภาพที่รุนแรงพอที่จะรบกวนการทำงานในชีวิตประจำวัน ประกอบกับผู้ตายส่วนใหญ่ยังอยู่ในวัยฉกรรจ์ซึ่งมีสุขภาพที่แข็งแรง จึงไม่ได้รับการตรวจสุขภาพอย่างจริงจังก่อนตาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุขภาพของระบบหัวใจและหลอดเลือด อย่างไรก็ตามในรายที่เคยมีการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจมาก่อน อาจพบมีรายงานความผิดปกติบ้าง เช่น

- สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ ได้รายงานถึงชาวไทยอายุ 29 ปี ซึ่งมีสุขภาพแข็งแรง จนกระทั่งเกิดหมดสติอย่างกะทันหันในขณะที่กำลังนั่งอ่านหนังสือพิมพ์ แต่สามารถปลุกตื่นขึ้นมาได้ และถูกนำส่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในขณะที่กำลังชักประวัติอยู่นั้นได้เกิดอาการหมดสติขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง ได้ทำการติดเครื่องตรวจจับคลื่นไฟฟ้าหัวใจ พบว่า มี ventricular fibrillation เกิดขึ้นด้วยเช่นกัน[31]

### 2.1.4 สิ่งที่ต้องตรวจพบหลังจากฟื้นสติ

- สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ พบผู้รอดชีวิตจากโหลตายอายุ 29 ปี โดยผลการตรวจร่างกายเป็นปกติ เช่น ความดันเลือด (158/72 mmHg) อัตราการเต้นของหัวใจ (75/min) และอุณหภูมิของร่างกาย (36.6 องศาเซลเซียส) คลื่นไฟฟ้าหัวใจแสดงถึงความปกติของ sinus rhythm, P wave, ช่วง PR ปกติ และมีช่วง QT ปกติ (408 ms) แต่มี right bundle branch block (RBBB) และ ST segment elevation ใน lead V<sub>2</sub>-V<sub>3</sub> [31]

- กุลวิ เนตรมณี และคณะได้ทำการตรวจหารูปแบบของคลื่นไฟฟ้าหัวใจในผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากไหลตาย โดยศึกษาจากชายไทย 27 คน ที่รอดชีวิตจากอาการหมดสติเนื่องจาก ventricular fibrillation โดยที่ผู้ป่วยทุกคนไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างหัวใจแต่อย่างใด จากการศึกษาพบว่า 16 คน จากผู้ป่วย 27 คน มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ผิดปกติแบบ Right Bundle Branch Block และ ST segment elevation ใน lead  $V_1$ - $V_3$  ซึ่งลักษณะที่ผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบนี้ตรงกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจใน Brugada syndrome[2]

ดังนั้น ลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ผิดปกติแบบ RBBB และ ST segment elevation ใน lead  $V_1$ - $V_3$  น่าจะเป็นตัวบ่งบอกการเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน (Arrhythmogenic marker) ในโรคไหลตายได้

## 2.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคไหลตาย

การบ่งบอกถึงสาเหตุนั้นยากที่จะบอกว่าเกิดขึ้นจากสาเหตุใด เนื่องจากการศึกษาโรคไหลตายยังมีน้อย การที่จะได้ข้อสรุปนั้นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก แต่จากการศึกษาที่มีอยู่อาจจะแบ่งสาเหตุของการเกิดโรคไหลตายได้เป็น 2 สาเหตุใหญ่ ๆ คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยทางพันธุกรรม

### 2.2.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

#### 2.2.1.1 ภาวะโปตัสเซียมต่ำ

ได้มีผู้ตั้งข้อสังเกตว่า เหตุใดโรคไหลตายจึงเกิดกับประชากรที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าประชากรในภาคอื่น ๆ ทั้งนี้อาจจะอธิบายปรากฏการณ์นี้ด้วยเหตุผลและข้อมูลต่อไปนี้

- ประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความชุกของโรคหลายโรคที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำ เช่น distal renal tubular acidosis, hypokalemic periodic paralysis และโรคนี้ัวไต[32]

- อาจเกิดจากการบริโภคอาหารของชาวอีสาน เนื่องจากอาหารหลักของชาวอีสานมักจะเป็นอาหารที่มีค่าโปตัสเซียมต่ำมาก ได้แก่ ข้าวเหนียวหนึ่ง ขนมหจีน และมะละกอดิบในรูปของส้มตำ และบริโภคอาหารในกลุ่มที่มีโปตัสเซียมสูงในปริมาณที่ไม่มากพอ ได้แก่ อาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์ของถั่วต่าง ๆ และผลไม้ ได้แก่ มะขม มะเขือเทศ กล้วย[33, 34]

นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการสูญเสียโปตัสเซียมทางเหงื่อในฤดูหนาวเป็น 1/3 และในฤดูร้อนเป็น 1/2 ของโปตัสเซียมที่ขับออกมาทางปัสสาวะ แสดงว่ามีภาวะบกพร่องโปตัสเซียมด้วย โดยมีสาเหตุจากการรับประทานโปตัสเซียมน้อย แต่มีการสูญเสียโปตัสเซียมของเหงื่อมาก ทำให้โปตัสเซียมในเลือดและปัสสาวะต่ำ[35]

จากเหตุผลและข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือน่าจะมีภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำ และภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำนี้เองน่าจะเป็นปัจจัยส่งเสริมภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะชนิด ventricular fibrillation

### 2.2.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดกับโรคไหลตาย

ความเครียดก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของโรคไหลตาย ดังเช่นที่ Goh KT และคณะ พบว่า อารมณ์ของคนงานไทยที่เกิดไหลตายโดยการชักประวัติเกี่ยวกับปัญหาต่าง ๆ จากผู้ใกล้ชิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นแรงงานไทยในประเทศสิงคโปร์ พบว่า ในกลุ่มที่เกิดไหลตายมีปัญหาทางอารมณ์มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีปัญหาที่มีผลกระทบต่อจิตใจ ได้แก่ ความห่างไกลจากครอบครัว ไม่สามารถปรับตัวได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ภาวะหนี้สิน และชั่วโมงการทำงานที่ยาวนาน โดยที่ภาวะความตึงเครียดทั้งหมดนี้มีผลต่อการตายอย่างเฉียบพลันได้[6]

### 2.2.2 ปัจจัยทางพันธุกรรม

สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ ได้ศึกษาลักษณะแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครอบครัวผู้เสียชีวิตจากไหลตาย โดยการส่งแบบสอบถามญาติผู้เสียชีวิตจากไหลตายที่สิงคโปร์ 45 ราย พบว่า 33 % มีประวัติญาติในครอบครัวเสียชีวิตเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุ 9 ครอบครัวเป็นญาติฝ่ายบิดา 2 ครอบครัวเป็นญาติฝ่ายมารดา และ 2 ครอบครัวเป็นญาติทั้งฝ่ายบิดาและมารดา และเมื่อศึกษาจาก pedigree ที่มีญาติมากกว่า 1 รายเสียชีวิตแบบเดียวกัน ทั้งที่มีรายงานในวารสารการแพทย์ และสอบถามจากญาติผู้เสียชีวิตจากไหลตาย จำนวน 32 ครอบครัว พบว่า 17 ครอบครัวมีญาติฝ่ายบิดา และ 15 ครอบครัวมีญาติฝ่ายมารดาที่เสียชีวิตเฉียบพลันระหว่างนอนหลับ [36] นอกจากนี้แล้ว ยังทำการศึกษาต่อไป พบว่าในครอบครัวไหลตาย 3 ครอบครัวที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada syndrome พบรูปแบบของ pedigree เป็นแบบ vertical transmission และแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบ autosomal dominant[47]

ปิยทัศน์ ทศนาวิวัฒน์ และคณะ ได้สัมภาษณ์เครือญาติและเพื่อนบ้านผู้ใกล้ชิด เพื่อยืนยันความชุกของการตายที่มีลักษณะอาการเข้ากับหลักเกณฑ์และคำนิยามของไหลตายใน

ครอบครัวที่มีโผลตายเกิดขึ้น การสอบถามทำในสายเครือญาติทุกระดับชั้นและทุกครอบครัวที่เกี่ยวข้อง มีการทดสอบยืนยันความถูกต้องของประวัติที่ได้ โดยการสอบถามรายละเอียดจากผู้รู้เห็นเหตุการณ์เดียวกันหลาย ๆ คน พบว่าในสมาชิก 49 ครอบครัวจำนวน 418 คน มีการตายที่มีลักษณะที่เข้าได้กับโรคโผลตายถึง 25 คน ใน 14 ครอบครัว ผู้ตายทุกคนเป็นชายมีอายุเฉลี่ย 31.26 ปี และมีช่วงอายุระหว่าง 25-50 ปี ในจำนวนนี้มีการตายในครอบครัวพ่อแม่เดียวกันถึง 6 ครอบครัว มีการตายของพี่ชาย น้องสาวรวม 3 คน ในครอบครัวเดียวกันถึง 3 ครอบครัว และ 2 คนในอีก 3 ครอบครัว[37] ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่า โรคโผลตายน่าจะถ่ายทอดทางพันธุกรรม

### 2.2.3 ปัจจัยร่วมระหว่างสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม

ผู้ที่มีความผิดปกติของยีนอยู่ก่อนแล้วถ้ามีปัจจัยเสี่ยงจากภายนอกมากระตุ้นอีก เช่น ลักษณะที่อยู่อาศัย สุขลักษณะในการบริโภคอาหาร หรือมีความเครียดเข้ามากระทบจิตใจ ก็จะเป็นปัจจัยเสริมทำให้บุคคลนั้นมีโอกาสต่อการเกิดการเต้นหัวใจผิดปกติแบบ ventricular fibrillation มากขึ้น

## 2.3 Brugada syndrome คืออะไร

Brugada syndrome คือ กลุ่มอาการที่มีการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันจาก ventricular fibrillation ที่เกิดกับผู้ที่มียุระหว่าง 30-40 ปี โดยที่ไม่มีความผิดปกติของหัวใจแต่อย่างใด จากการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบว่ามียุลักษณะเป็นแบบ Right Bundle Branch Block (RBBB) และ ST segment elevation ใน lead V<sub>1</sub>-V<sub>3</sub> ส่วนใหญ่เกิดในผู้ชาย[10, 49]

- Atarashi และคณะ รายงานว่า จากผู้ป่วย Brugada syndrome ทั้งหมด 63 คน เป็นผู้ชาย 60 คน (คิดเป็นร้อยละ 95.23)[38]

- Brugada และคณะ รายงานว่า จากผู้ป่วย Brugada syndrome ทั้งหมด 63 คน เป็นผู้ชาย 56 คน (คิดเป็นร้อยละ 88.89)[38]

### 2.3.1 รูปแบบคลื่นไฟฟ้าหัวใจและลักษณะอาการทางคลินิกของ Brugada syndrome

- Atarashi และคณะ พบว่าจากผู้ป่วย Brugada syndrome 63 คน มีผู้ป่วยที่แสดงอาการ 29 คน อาการดังกล่าว ประกอบด้วยเป็นลมหมดสติ 12 คน เกิด ventricular fibrillation 17 คน ส่วนผู้ป่วยอีก 34 คน ไม่แสดงอาการใด ๆ [38]

- Brugada และคณะ พบว่าจากผู้ป่วย Brugada syndrome 63 คน มีผู้ป่วยที่แสดงอาการ 41 คน (คิดเป็นร้อยละ 65) ซึ่งอาการดังกล่าวประกอบด้วย เป็นลมหมดสติ ร้อยละ 22 หรือเกิดการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันเนื่องมาจาก ventricular fibrillation ร้อยละ 78 ส่วนผู้ป่วย Brugada syndrome อีก 22 คนไม่มีอาการใด ๆ [38]

ดังนั้น ผู้ป่วย Brugada syndrome จะมีรูปแบบของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG) ผิดปกติ แบบ Right Bundle Branch Block (RBBB) และ ST segment elevation ใน lead  $V_1$ - $V_3$  [10, 49]

### 2.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโหลตาย และ Brugada syndrome

ผู้ที่รอดชีวิตจากโหลตายส่วนใหญ่ตรวจพบคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ RBBB และ ST segment elevation ใน lead  $V_1$ - $V_3$  ซึ่งลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบนี้เป็นลักษณะเดียวกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่พบในผู้ป่วย Brugada syndrome [45] นอกจากนี้แล้วลักษณะอาการทางคลินิกของโหลตาย และ Brugada syndrome มีลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกันมาก คือเกิดในเพศชายเป็นส่วนใหญ่ โดยมากเกิดในคนวัยหนุ่มที่แข็งแรงไม่มีโรคประจำตัวมาก่อน มักจะตายอย่างกะทันหันในขณะที่นอนหลับหรือพักผ่อน โดยที่ไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างหัวใจแต่อย่างใด จากลักษณะอาการทางคลินิกและคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่เหมือนกันของโหลตาย และ Brugada syndrome จึงน่าจะเกิดมาจากสาเหตุทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน

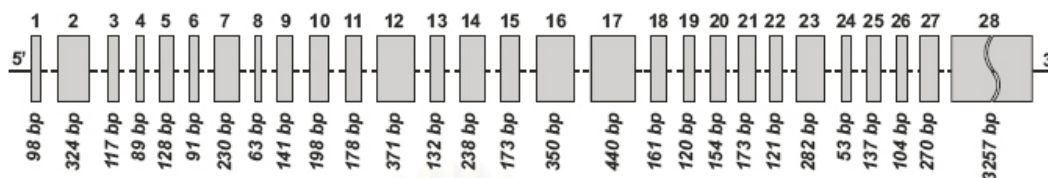
### 2.3.3 ปัจจัยทางพันธุกรรมของ Brugada syndrome

Brugada syndrome เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยรูปแบบของการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant และจากรายงานจากหลาย ๆ คณะวิจัยพบว่า Brugada syndrome เป็น genetic heterogeneity หมายความว่า โรคเดียวกันแต่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ต่างกัน ซึ่งยีนที่น่าจะเป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ ion channel ต่าง ๆ ในหัวใจ เช่น sodium channel หรือ potassium channel

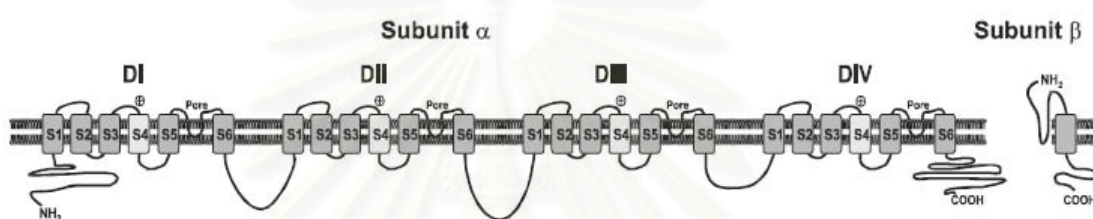
#### 2.3.3.1 Sodium channel

ยีนที่สร้าง cardiac sodium channel ที่มีหลายคณะวิจัยค้นพบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิด Brugada syndrome นั่นคือ ยีน *SCN5A* ซึ่งเป็น  $\alpha$  subunit ของ cardiac sodium channel gene ประกอบด้วย 28 exons ดังรูปที่ 1 ซึ่งจะสร้าง  $\alpha$  subunit cardiac sodium channel protein ซึ่งประกอบไปด้วย 4 domains แต่ละ domain ประกอบด้วย 6 transmembrane โดย

ที่มีปลาย carboxy (COOH) และปลาย amino (NH<sub>2</sub>) อยู่ใน intracellular ดังรูปที่ 2 ซึ่งประมาณ 15-20% ของผู้ป่วย Brugada syndrome เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนนี้[39, 61]



รูปที่ 1 แสดงจำนวน exon ทั้งหมด 28 exons ของยีน *SCN5A*



รูปที่ 2 แสดง  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit ของ sodium channel

การกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ทำให้เกิด Brugada syndrome

- **Qiuyun Chen และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* โดยวิธี sequence analysis ดังต่อไปนี้[48]

1. เกิดการ insertion ของ 2 nucleotide, AA ที่บริเวณ intron 5 ซึ่งจะทำให้ลำดับเบสที่บริเวณ splice-donor ของบริเวณ intron 5 ผิดไป
2. เกิดการ deletion ของ nucleotide A ที่ codon 1397 ซึ่งจะทำให้เกิด Stop codon ผลก็คือ จะมีส่วนของ DIII/S6 และ DIV/S1-6 และส่วนปลาย carboxy ของ cardiac sodium channel ขาดหายไป
3. เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสที่บริเวณ exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1620 (T1620M) ร่วมกับการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1232 (R1232W) ซึ่งในตำแหน่ง codon ที่ 1620 (T1620M) ยังมีอีกหลายคณะวิจัยตรวจพบ ได้แก่



- Wang และคณะ

- Baroudi และคณะ

- Wan X และคณะ

● **Silvia G และคณะ** ได้ทำการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ในผู้ป่วย Brugada syndrome 52 คน โดยวิธี SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* 8 คน (คิดเป็นร้อยละ 15) โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยที่แสดงอาการ 3 คน ไม่แสดงอาการ 5 คน จากการวิจัยในครั้งนี้พบบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ทั้งหมด 8 บริเวณ คือ[61]

1. exon 7 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 298 (V294M)
2. exon 8 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 319 (G319F)
3. exon 12 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 567 (L567Q)
4. exon 16 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 892 (F892I)
5. exon 17 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง 965 (R965C) และ 1053 (E1053K)
6. exon 18 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1114 (D1114N)
7. exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1795 (Y1795H)

● **Rook MB และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* ที่ทำให้เกิด Brugada syndrome อีก 2 ตำแหน่ง คือ[53]

1. exon 26 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1512 (R1512W)
2. exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1924 (A1924T)

- **Akai J และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* อีก 1 ตำแหน่ง คือ exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1710 (S1710L)[62]
- **Veldkamp และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* อีก 1 ตำแหน่ง คือ เกิดการ insertion ของกรดอะมิโน aspartic acid ที่ codon ที่ 1795 (1795insD)[56]
- **Baroudi G และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* อีก 1 ตำแหน่ง คือ บริเวณ exon 24 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1432 (R1432G)[54]

### 2.3.3.2 Potassium channel

ยีนที่สร้าง Potassium channel protein ที่เกี่ยวข้องกับ Brugada syndrome ได้แก่ *KCND2* ซึ่งประกอบไปด้วย 6 exon และยีน *KCND3* ซึ่งประกอบไปด้วย 7 exon โดยที่ยีนทั้ง 2 นี้ เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Potassium channel protein ที่เกี่ยวข้องกับ transient outward current ( $I_{to}$ ) ซึ่งเมื่อเกิดการกลายพันธุ์แล้วจะส่งผลให้เกิด Brugada syndrome แต่ยังไม่มียางานการกลายพันธุ์ของยีนนี้ที่ทำให้เกิด Brugada syndrome มีเพียงแต่กล่าวว่ายีนทั้ง 2 นี้ น่าจะเป็น candidate เท่านั้น[55]

### 2.3.4 การกลายพันธุ์ของ Sodium channel และ potassium channel ทำให้เกิด Brugada syndrome ได้อย่างไร

*SCN5A* เป็นยีนที่สร้าง  $\alpha$  subunit cardiac sodium channel ที่เกี่ยวข้องกับ ศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน (action potential) ของกล้ามเนื้อหัวใจ

#### 2.3.4.1 คุณสมบัติทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ[40]

ความเข้มข้นของไอออนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และของเหลวภายนอกเซลล์ (extracellular fluid) มีความแตกต่างกัน คือ ภายในเซลล์มีโปตัสเซียม (ประมาณ 150 mmole) สูงกว่านอกเซลล์ (ประมาณ 4 mmole) และโซเดียมอยู่ภายนอกเซลล์ (140 mmole) สูงกว่าภายในเซลล์ (ประมาณ 30 mmole) ภาวะปกติ ผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีความสามารถในการซึมผ่านของโปตัสเซียมสูง ดังนั้น ถ้าสอดขั้วไฟฟ้าขนาดเล็กเข้าไปภายในเซลล์ จะได้ความต่างศักย์ระหว่างภายในเซลล์และนอกเซลล์ โดยภายในเซลล์มีค่าเป็นลบ ค่าของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ขณะพักในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยทั่ว ๆ ไปเท่ากับ -80 ถึง -90

มิลลิโวลต์ ค่าของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปได้เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ถูกกระตุ้น ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการนำผ่านของไอออนผ่านผนังเซลล์ เกิดเป็นศักย์ไฟฟ้า ทำงานเกิดขึ้น ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ

ระยะ 0 หมายถึง ระยะที่มีรีโพลาไรเซชันอย่างรวดเร็ว และจะเกิดการเปลี่ยน ศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์จากลบไปเป็นบวก เนื่องจากมีโซเดียมผ่านเข้าไปในเซลล์

ระยะ 1 หมายถึง ระยะที่มีรีโพลาไรเซชันอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจาก inactivation ของโซเดียม และactivation ของคลอไรด์ และบางส่วนจาก outward K current

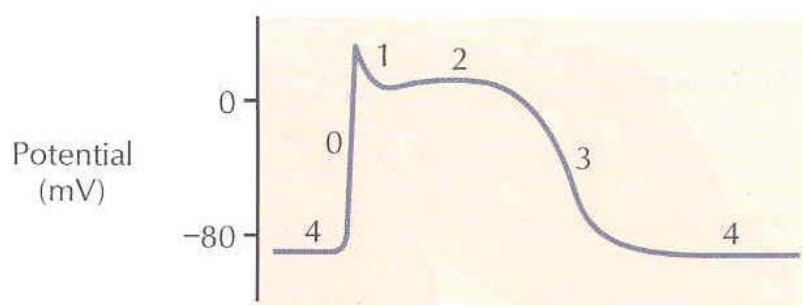
ระยะ 2 หมายถึง ระยะที่มีรีโพลาไรเซชันคงตัวอยู่เรื่อย ๆ หรือ plateau ซึ่งเป็น ลักษณะเฉพาะของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ

ระยะ 3 หมายถึง ระยะที่มีรีโพลาไรเซชันอย่างรวดเร็ว กลับสู่ศักย์ไฟฟ้าขณะพัก เกิดจาก activation ของ K current ทำให้ไปดัดเชื่อมออกไปนอกเซลล์ และมี inactivation ของ Ca channel

ระยะ 4 หมายถึง ระยะรีโพลาไรเซชันในขณะกล้ามเนื้อหัวใจคลายตัว ซึ่งมีความ ต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์กลับสู่ระดับเดิมก่อนเกิดศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน ระดับของโซเดียมและ ไปดัดเชื่อมภายในเซลล์จะกลับสู่ปกติ

#### 2.3.4.2 activation และ inactivation gate ของ Sodium และ Potassium channel

การทำงานของประตูความต่างศักย์ของช่องทางโซเดียมใน 3 สภาวะ แต่ละช่องทางมี 2 ประตู ประตูหนึ่งอยู่ที่ช่องทางด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเรียก activation gate และ อีกประตูหนึ่งอยู่ที่ช่องทางด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเรียก inactivation gate ซึ่งสภาวะของเยื่อหุ้ม เซลล์ขณะพัก จะมีความต่างศักย์ประมาณ -90 มิลลิโวลต์ ดังรูปที่ 3 ในสภาวะนี้ activation gate จะ ปิดสนิท ป้องกันการผ่านเข้าเซลล์ของโซเดียม แต่ inactivation gate จะเปิด เมื่อมีความต่างศักย์ของ เยื่อหุ้มเซลล์ลดลงจาก -90 มิลลิโวลต์ มาอยู่ระหว่าง -70 และ -50 มิลลิโวลต์ จะทำให้ activation gate เปลี่ยนรูปร่างไปอยู่ในท่าเปิดเรียกว่า activated state ซึ่งทำให้โซเดียมสามารถวิ่งเข้าเซลล์ได้ อย่างมากมายเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 500-5000 เท่า ระยะต่อมาภายในเศษหนึ่งส่วนหมื่นของวินาที inactivation gate จะปิดทำให้โซเดียมไม่สามารถผ่านเข้าได้ ทำให้ความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ กลับคืนสู่ปกติ เกิดรีโพลาไรเซชัน inactivation gate นี้จะไม่เปิดอีกจนกว่าความต่างศักย์ของเยื่อหุ้ม เซลล์กลับคืนสู่ภาวะปกติขณะพัก



รูปที่ 3 แสดงถึงศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ในระยะต่าง ๆ

ในส่วนของความต่างศักย์ของช่องทางโพตัสเซียมในระยะพัก และระยะเกิดศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน ในระยะพัก ประตูนี้จะปิด โพตัสเซียมไม่สามารถผ่านเข้าออกจากเซลล์ได้ เมื่อความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงจาก -90 มิลลิโวลต์ มาจนถึง +35 มิลลิโวลต์ จะทำให้ประตูค่อย ๆ เปิดออกช้า ๆ ทำให้โพตัสเซียมผ่านออกจากเซลล์ แต่เนื่องจากประตูโพตัสเซียมเปิดช้า โดยจะเปิดพร้อม ๆ กับที่ประตูโซเดียม (inactivation gate) ปิด ดังนั้น ระยะที่ลดการนำโซเดียมเข้าเซลล์จะตรงกับระยะที่มีการเพิ่มโพตัสเซียมออกจากเซลล์

#### 2.3.4.3 การกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ทำให้เกิด *Brugada syndrome* ได้อย่างไร

การกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ใน *Brugada syndrome* เป็นแบบ loss of function[41] เนื่องมาจากการกลายพันธุ์ทำให้เกิด inactivation ของ Sodium channel เร็วกว่าปกติ ดังนั้น จึงทำให้ปริมาณของโซเดียมเข้าเซลล์น้อยกว่าปกติ ซึ่งความผิดปกตินี้เกิดขึ้นในช่วงปลายระยะ 0 ของศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ และส่งผลให้เกิดระยะ 1 เร็วขึ้นกว่าปกติ ดังนั้น การกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ที่ทำให้เกิด *Brugada syndrome* จึงเกี่ยวข้องกับ inactivation ของ sodium channel ทำให้เกิดรีโพลาไรเซชันในกล้ามเนื้อหัวใจเร็วกว่าปกติ

*Brugada syndrome* จะเกี่ยวข้องกับกล้ามเนื้อหัวใจในชั้น epicardium และ endocardium โดยการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ทำให้เกิด inactivation ของ sodium channel ในชั้น epicardium เร็วกว่าปกติ ในขณะที่ในชั้น endocardium เป็นไปตามปกติ ดังนั้น ใน epicardium ของผู้ป่วย *Brugada syndrome* จึงมีจำนวนของโซเดียมที่เข้าเซลล์น้อยกว่า และเกิดรีโพลาไรเซชันได้เร็วกว่าใน endocardium จึงทำให้เกิดความต่างศักย์ระหว่าง epicardium และ endocardium ขึ้นในช่วงระยะ 1 ของศักย์ไฟฟ้าทำงานในกล้ามเนื้อหัวใจ (Transmural voltage gradient) ซึ่ง Transmural voltage gradient นี้ทำให้เกิดคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ ST segment elevation

#### 2.3.4.4 การกลายพันธุ์ของยีน *KCND2* และ *KCND3* ทำให้เกิดคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ *Brugada syndrome* ได้อย่างไรในสัตว์ทดลอง

เนื่องจาก *KCND2* และ *KCND3* เป็นยีนที่สร้าง Potassium channel ที่เกี่ยวข้องกับกระแสของโปรตัสเซียมที่ไหลออกนอกเซลล์ (transient outward current ;  $I_{to}$ ) ซึ่งจะเกี่ยวข้องในปลายระยะ 1 ของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ การกลายพันธุ์ของยีน *KCND2* และ *KCND3* ทำให้  $I_{to}$  ในปลายระยะที่ 1 ของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจนี้เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ ทำให้เกิดรีโพลาไรเซชันในกล้ามเนื้อหัวใจเร็วขึ้นกว่าปกติ ดังนั้น การกลายพันธุ์ของยีน *KCND2* และ *KCND3* ใน *Brugada syndrome* จึงเป็นแบบ gain of function[42]

กลายพันธุ์ของยีน *KCND2* และ *KCND3* ที่ทำให้เกิดคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ *Brugada syndrome* ในเนื้อเยื่อสัตว์ทดลอง เนื่องจาก การเพิ่มขึ้นของโปรตัสเซียมที่ไหลออกนอกเซลล์ในปลายระยะที่ 1 ของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจในชั้น epicardium โดยในขณะที่ชั้น endocardium เป็นไปตามปกติ จึงทำให้เกิด Transmural voltage gradient ซึ่งเป็นสาเหตุของคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ผิดปกติแบบ ST segment elevation[43] อย่างไรก็ตาม เทียมจิต และคณะได้ ศึกษา ยีน *KCND3* ในผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโผลตายที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ *Brugada syndrome* ทั้งหมด 3 ครอบครัวไม่พบการกลายพันธุ์

#### 2.4 การตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

SSCP เป็นวิธีตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งในขั้นดีเอ็นเอ (point mutation) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณที่ไม่มีผลต่อการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) หรือเป็นตำแหน่งที่ที่ไม่ทราบแน่ชัด SSCP อาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขด หรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างที่จำเพาะ หรือมี conformation ที่จำเพาะ ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน nondenaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เบสเดียวกันก็สามารถทำให้เกิดโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเร็วช้าต่างกัน ทำให้เห็น band shift ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเกิดขึ้นภายในดีเอ็นเอ

ความไวของการตรวจ SSCP ขึ้นกับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ เนื่องจากการตรวจหาความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันเพียง 1 เบส ดังนั้น ถ้าสายดีเอ็นเอยาวมาก โอกาสในการตรวจพบ SSCP ก็จะน้อย ขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมโดยวิธีนี้ คือ ไม่เกิน 200 นิวคลีโอไทด์ ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการ

ตรวจสอบ เช่น ค่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นและสัดส่วนของเจล องค์ประกอบของเบส ตำแหน่งและชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลองแต่ละแห่ง

## 2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มอาการบรูคาตาเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal dominant[47] พบว่าผู้ป่วย บรูคาตามีความผิดปกติของ cardiac ion channel และจากรายงานการวิจัยหลาย ๆ ฉบับพบว่า โรคบรูคาตาเกิดจากความผิดปกติของยีน *SCN5A* ที่สร้าง sodium channel ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้

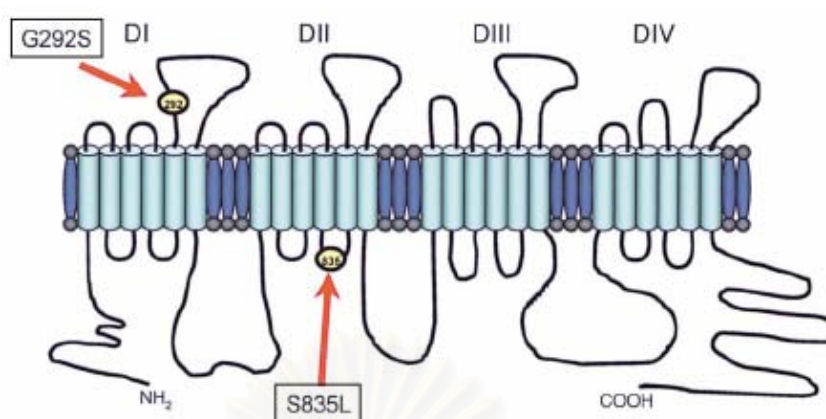
1. T1620M ที่บริเวณ extracellular loop ระหว่าง segment ที่ 5 และ 6 ของ domain ที่ 4 [48-51] ดังรูปที่ 5
2. R1512W ที่บริเวณ intracellular loop ระหว่าง segment ที่ 6 ของ domain ที่ 3 กับ segment ที่ 1 ของ domain ที่ 4 [52,53] ดังรูปที่ 5
3. R1432G ที่บริเวณ P segment ของ domain 3 [52,54] ดังรูปที่ 5
4. 1795insD ที่ c-terminal domain [55,56] ดังรูปที่ 5

นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่ตำแหน่งอื่น ๆ อีก เช่น

Hong K และคณะ[25] ได้พบการกลายพันธุ์ R367H โดยมีการแทนที่เบสจาก G ด้วย A ใน exon 9

Schulze-Bahr E และคณะ[26] ได้พบการกลายพันธุ์ 5 ตำแหน่ง คือ 2602delC (E867X), 5425C>A (S1812X), 2581\_2582delTT (F861fs951X), 3673G>A (E1225K), 4435\_4437delAAG (K1479del)

Nimura H และคณะ[28] พบการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งใน *SCN5A* คือ G292S ในตำแหน่ง pore-lining region ระหว่าง DIS5 และ DIS6 (transmembrane segment) และ S835L ในตำแหน่ง intracellular loop ระหว่าง DIIS4 กับ DIIS5 ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งที่ถูกรายงานโดย Nimura H และคณะ

Chen Q และคณะ[48] ได้รายงานไว้ ดังนี้

- 1) insertion ของนิวคลีโอไทด์ AA ที่บริเวณ Splice donor ของ intron 7
- 2) deletion ของนิวคลีโอไทด์ A ที่ codon 1397
- 3) การแทนที่เบส C เป็น T ที่ตำแหน่ง 1232(R1232W) ซึ่งอยู่บริเวณ extracellular loop ระหว่าง segment 1 กับ segment 2 ของ domain 3 ดังรูปที่ 5

Kyndt F และคณะ[57] ตรวจสอบพบ missense mutation (G1406R) ซึ่งเป็นบริเวณของ pore region (P segment) ของ domain 3 ดังรูปที่ 5

Vatta M และคณะ[19] ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* ในผู้ป่วย Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome ในคนไทย (ไหลตาย) และ คนญี่ปุ่นจำนวน 10 คน พบการกลายพันธุ์ใน 3 คน ดังนี้

- 1) R367H ซึ่งเป็นบริเวณของ p segment ที่ domain 1
- 2) A735V ซึ่งเป็นบริเวณของ extracellular loop ระหว่าง segment 1 กับ segment 2 ของ domain 2
- 3) R1192Q ซึ่งเป็นบริเวณของ intracellular loop ระหว่าง segment 6 ของ domain 2 กับ segment 1 ของ domain 3

Wang DW และคณะ[58] พบว่ามี G298S ซึ่งอยู่ที่ intersegmental loop ระหว่าง segment 5 และ 6 ของ domain 1 และพบ D1595N ที่ segment 3 ของ domain 4

Levy-Nissenbaum E และคณะ[59] ตรวจสอบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยโรคจำนวน 7 ราย พบว่า มีการกลายพันธุ์ 2 ราย โดยพบ G35S และ R104Q

Vatta M และคณะ[60] พบว่า มีการกลายพันธุ์ ดังต่อไปนี้

- 1) G351V ที่บริเวณ p segment ของ segment 5 และ segment 6 ของ domain 1
- 2) 20-bp deletion ที่ splice acceptor ของ exon 5 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ intracellular loop ระหว่าง segment 2 กับ segment 3 ของ domain 1
- 3) K126E ที่ intracellular loop ระหว่าง segment 2 กับ segment 3 ของ domain 1

Priori SG และคณะ[61] ได้ทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* ในผู้ป่วย 52 คน โดยใช้วิธี SSCP (single strand conformation polymorphism) พบว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ 8 คน (ร้อยละ 15) โดยแสดงอาการ 3 คนและไม่แสดงอาการ 5 คน โดยพบทั้งหมด 8 ตำแหน่ง คือ

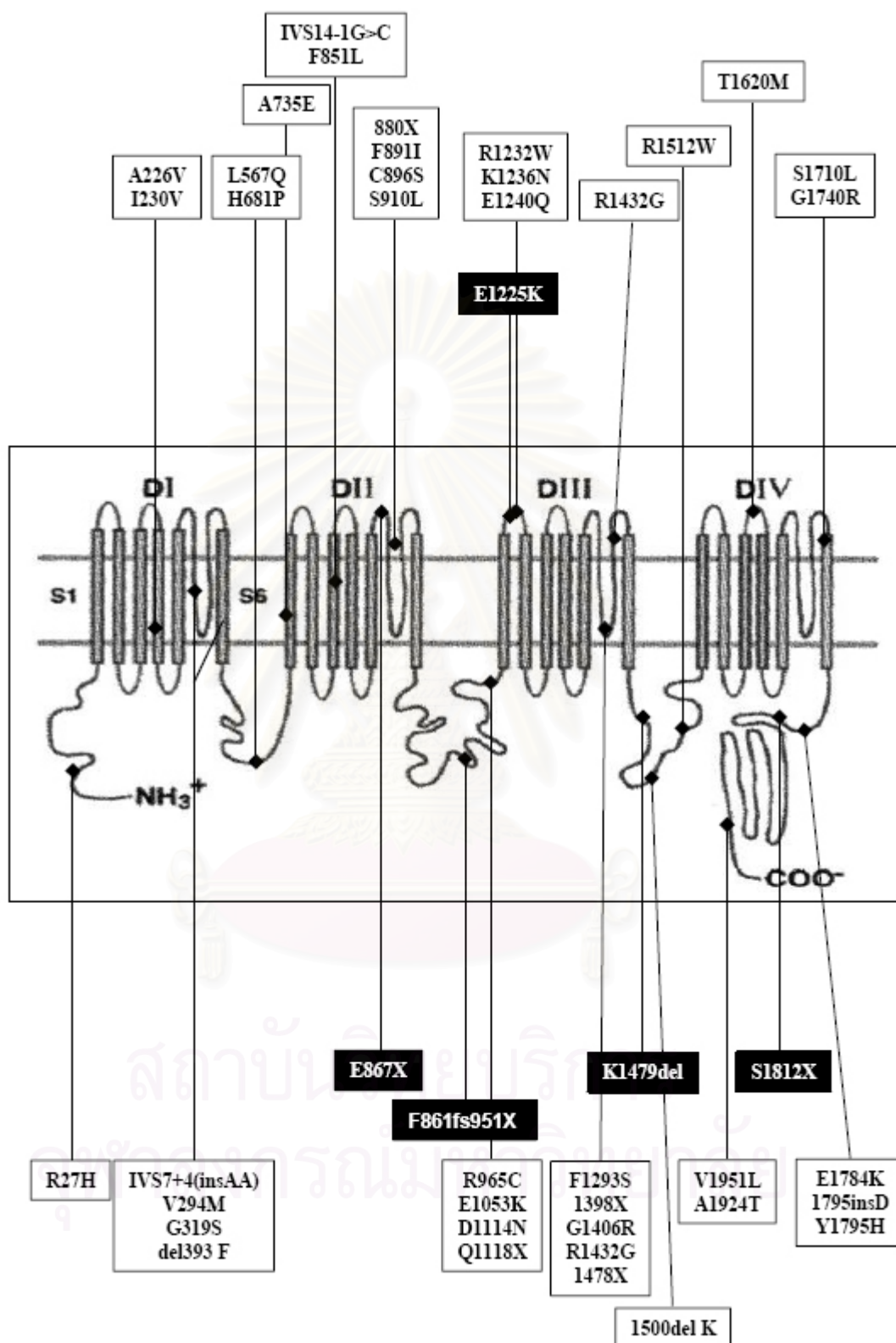
- 1) exon 7 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน V294M ดังรูปที่ 5
- 2) exon 8 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน G319F
- 3) exon 12 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน L567Q ดังรูปที่ 5
- 4) exon 16 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน F892I
- 5) exon 17 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ R965C และ E1053K

ดังรูปที่ 5

- 6) exon 18 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน D1114N ดังรูปที่ 5
- 7) exon 28 พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Y1795H ดังรูปที่ 5

Akai J และคณะ[62] รายงานบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ *SCN5A* พบ S1710L ที่ exon 28 ดังรูปที่ 5





รูปที่ 5 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ในหลายๆ ตำแหน่งที่เคยถูกรายงานไว้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

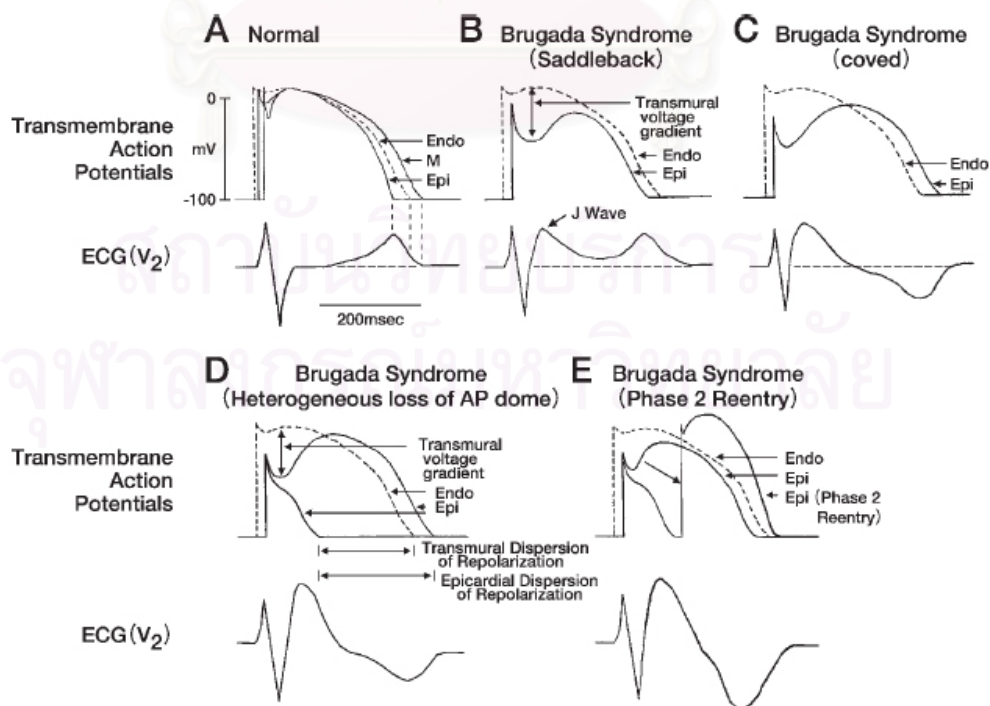
รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Descriptive study

#### 3.2 ประชากรศึกษา

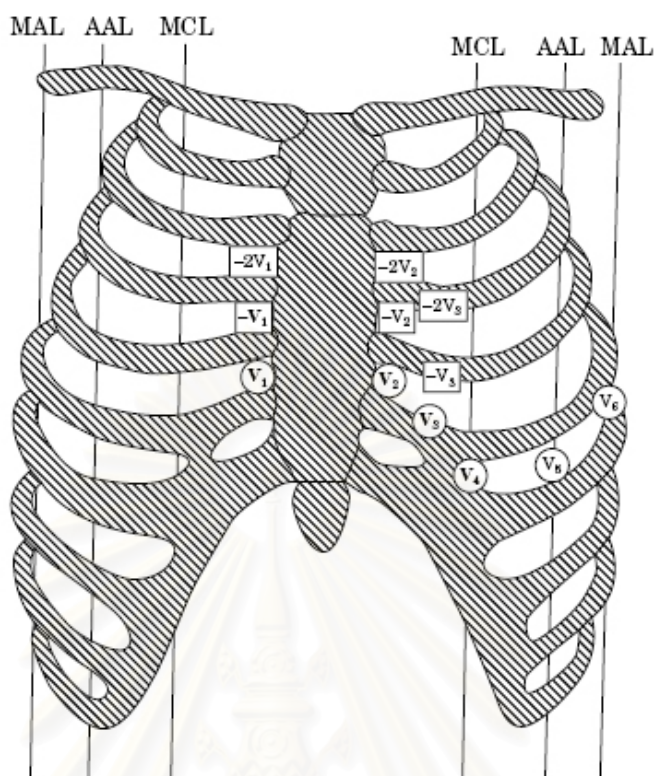
ประชากรเป้าหมาย คือ ประชากรไทยที่มีลักษณะอาการเข้าได้กับโรคไหลตาย ดังนี้

##### 1. เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา (Inclusion Criteria)

ผู้รอดชีวิตจากโรคไหลตาย คือ ชาวไทยที่อายุมากกว่า 15 ปี มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว โดยเกิด cardiac arrest หรือ polymorphic ventricular tachycardia/ventricular fibrillation (VT/VF) ที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Right Bundle Branch Block (RBBB) และ ST-segment elevation (ดังรูปที่ 6 D และ E) ใน Lead  $V_1$ - $V_3$  ติด Lead ต่าง ๆ บนตัวผู้รอดชีวิตจากไหลตาย ดังรูปที่ 7 ( $-V_1$  -  $-V_3$  และ  $-2V_1$  -  $-2V_3$ ) และได้ทำ cardiopulmonary restriction สำเร็จ ไม่มีประวัติการฉายยาที่ทำให้เกิด polymorphic VT/VF ตรวจระบบหัวใจและหลอดเลือดปกติ ตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจไม่พบ long QT interval, blood chemistry, chest X-ray, echocardiography, และ coronary angiography อยู่ในเกณฑ์ปกติ



รูปที่ 6 แสดงรูปแบบของ ECG ของ Brugada syndrome



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ในการติด lead เพื่อทำการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

## 2. เกณฑ์ในการคัดเลือกรอกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

1. ผู้ที่ไม่ร่วมมือในการทำวิจัย
2. ผู้ที่ 12 leads ECG มี prolong QT interval ( $QTc > 0.44$  sec) มากกว่า
- 3 Leads หรือมี second, high grade หรือ third degree AV block

## 3.3 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

### วัสดุอุปกรณ์

1. Pipette tip : 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l
2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml
3. Automatic adjustable micropipette : P2(0.2-2  $\mu$ l), P10(0.5-1.0  $\mu$ l),  
P20(5-20 $\mu$ l), P100(20-100 $\mu$ l), P200(20-200  $\mu$ l), P500(200-500  $\mu$ l),  
P1000(0.1-1 ml)
4. Flask : 250 ml

5. Cylinder : 100 ml, 250 ml, 500 ml
6. Parafilm
7. Electrophoresis chamber set
8. Vortex
9. Microcentrifuge
10. DNA Thermal cycler
11. Power supply
12. Spectrophotometers
13. Refrigerator 4<sup>o</sup> C
14. Deep freezer -80<sup>o</sup> C
15. ECG (Electrocardiogram)
16. Glove

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Absolute ethanol
2. Agarose (Molecular grade)
3. Ammonium acetate
4. Boric acid
5. Ethidium bromide
6. Mineral oil
7. Phenol
8. Chloroform
9. Sucrose

10. Tris base
11. Triton X-100
12. 10 base pair DNA ladder
13. 25 base pair DNA ladder
14. 100 base pair DNA ladder
15. Polyacrylamide
16. Ammonium persulfate
17. Temed
18. Glycerol
19. 10X PCR buffer
20. Magnesium chloride
21. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
22. Oligonucleotide primers
23. Tag DNA polymerase
24. Genomic DNA samples
25. Autoclave H<sub>2</sub>O

### 3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการตรวจหาผู้รอดชีวิตจากโหลตาย และออกเก็บตัวอย่างเลือด ดังนี้

#### 1. กลุ่มตัวอย่างเลือดของผู้รอดชีวิตจากโหลตาย

ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากผู้รอดชีวิตจากโหลตายทั้งหมด 10 คน โดยคณะวิจัยจะเก็บตัวอย่างผู้รอดชีวิตจากโหลตายที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ หรือออกไปเก็บตัวอย่างเลือดที่โรงพยาบาลหรือสถานีนอนามัยใกล้บ้าน

#### 2. กลุ่มตัวอย่างเลือดคนปกติ

ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากคนปกติที่ไม่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบกลุ่มอาการบรูคาดา ทั้งหมด 50 คน โดยคณะวิจัยเก็บตัวอย่างเลือดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ หรือโรงพยาบาลหรือสถานีนอนามัยใกล้บ้าน

#### 3. ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างเลือดที่ได้นำมาศึกษา ดังนี้

##### ขั้นที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

1) นำเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที

2) เก็บส่วน buffy coat ใส่ในหลอด polypropylene หลอดใหม่

3) เติม lysis buffer I ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 g (rcf) เป็นเวลา 8 นาที แล้วเทส่วนใส (supernatant) ที่

5) เติม lysis buffer I ที่แช่เย็น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 g เป็นเวลา 8 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

6) เติม lysis buffer II 900 ไมโครลิตร ( $\mu\text{l}$ ) สารละลาย proteinase K 10 ไมโครลิตร และ 10 % SDS 50 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที

7) นำส่วนผสมทั้งหมดแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค้างคืน

8) เติม phenal-chloroform-isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

9) ดูดส่วนบนใสในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร

10) เติม 7.5 M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  ลงไปครึ่งหนึ่งของปริมาตรที่ดูดได้จากข้อ 9 และเติม 100% ethanol ลงไปในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรที่ดูดได้จากข้อ 9 แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ จะเห็นสายดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นตะกอนสีขาว คัดที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง

11) เติม 70% ethanol เพื่อล้างตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

12) ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ที่ได้ด้วย TE buffer ปริมาตร 20-300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอละลายหมด

13) นำไปวัดเพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ต่อไป

**ขั้นที่ 2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยจะทำ PCR reaction ในบริเวณ exon ต่างๆ โดย**

Primers ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในการศึกษาบริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ในยีน *SCN5A* ที่ศึกษา\* ได้แก่ Exon ที่ 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 26 และ 28

Primers ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในการศึกษาบริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ที่ศึกษา ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** แสดง primers ของแต่ละ exon ที่ใช้ในการศึกษา

Exon	Forward primer	Reverse primer
1	GCCGCTGAGCCTGCGCCCAGT	GGAAAGTTGGGCGGCAGCAG
2	CGTCTGCCACCCCTGCTCTCT	CCTCTTCCCCCTCTGCTCCATT
3	AGTCCAAGGGCTCTGAGCCAA	GGTACTCAGCAGGTATTAAGTCAA
8	CGAGTGCCCTCACCAGCATG	GGAGACTCCCCTGGCAGGACAA
11	AAACGTCCGTTCCCTCCACTCT	AACCCACAGCTGGGATTACCATT
12	GCCAGTGGCTCAAAGACAGGCT	CCTGGGCACTGGTCCGGCGCA
	CACCACACATCACTGCTGGTGC	GGAAGTCTGATCAGTTTGGGAGA
13	CCCTTTTCCCAGCTGACGCAA	GTCTAAAGCAGGCCAAGACAAATG
17	GGGACTGGATGGCTTGGCATGGT	CGGGGAGTAGGGGGTGGCAATG
	GCCCAGGGCCAGCTGCCAGCT	CTGTATATGTAGGTGCCTTATACATG

18	AGGGTCTAAACCCCCAGGGTCA	CCCAGCTGGCTTCAGGGACAAA
19	GAGGCCAAAGGCTGCTACTCAG	CCTGTCCCCTCTGGGTGGA ACT
26	CCATGCTGGGGCCTCTGAGAAC	GGCTCTGATGGCTGGCCATGTG
28	GAGCCCAGCCGTGGGCATCCT	GTCCCCACTCACCATGGGCAG
	CCAACCAGATAAGCCTCATCAACA	CCGCCTGCTGACGGAAGAGGA
	TGCTGCAACGCTCTTTGAAGCAT	AAAGGGCTGCTTTCAGTGTGTCCT

\*Genomics 34, 9-16 (1996)

1) หลังจากนั้นเตรียม mixture ตามอัตราส่วน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา (μl)
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.2
10x kinase buffer (with 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10x	1
5 U/μl Taq DNA polymerase	2 U/μl	0.04
50 ng/μl DNA template	200 ng	4
20 μM labelled sense-primer	0.2 μM	0.1
20 μM antisense-primer	0.2 μM	0.1
น้ำกลั่น	-	2.56
	ปริมาตรรวม	10

2) เขย่าให้เข้ากันแล้ว spin down โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลาสั้นๆ เพื่อให้ mixture ลงมารวมกันที่ก้นหลอด

3) นำ mixture ที่ได้เข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ของแต่ละ exons ดังตาราง



ตารางที่ 3 แสดงสถานะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 1, 2, 3 และ 8

Exons	1			2			3			8		
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation	95	15		95	15		95	15		95	15	
Denature	94	0.45	} 30	94	0.45	} 30	94	0.45	} 35	94	0.45	} 35
Annealing	59	0.45		59	0.45		58	0.45		58	0.45	
Extension	72	0.45		72	0.45		72	0.45		72	0.45	
Final extension	72	7		72	7		72	7		72	7	
Hold	4	∞		4	∞		4	∞		4	∞	

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 11, 12-1, 12-2 และ 13

Exons	11			12-1			12-2			13		
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation	95	15		95	15		95	15		95	15	
Denature	94	0.45	} 40	94	0.45	} 35	94	0.45	} 35	94	0.45	} 35
Annealing	58	0.45		58	0.45		58	0.45		58	0.45	
Extension	72	0.45		72	0.45		72	0.45		72	0.45	
Final extension	72	7		72	7		72	7		72	7	
Hold	4	∞		4	∞		4	∞		4	∞	

ตารางที่ 5 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 17-1, 17-2, 18 และ 19

Exons	17-1			17-2			18			19		
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation	95	15	} 35	95	15	} 35	95	15	} 35	95	15	} 39
Denature	94	0.45		94	0.45		94	0.45				
Annealing	66	0.45		58	0.45		63	0.45				
Extension	72	0.45		72	0.45		72	0.45				
Final extension	72	7		72	7		72	7		72	7	
Hold	4	∞		4	∞		4	∞		4	∞	

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Exon 26, 28-3, 28-4 และ 28-5

Exons	26			28-3			28-4			28-5		
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation	95	15	} 35	95	15	} 35	95	15	} 35	95	15	} 35
Denature	94	0.45		94	0.45		94	0.45		94	0.45	
Annealing	58	0.45		59	0.45		59	0.45		58	0.45	
Extension	72	0.45		72	0.45		72	0.45		72	0.45	
Final extension	72	7		72	7		72	7		72	7	
Hold	4	∞		4	∞		4	∞		4	∞	

- 4) นำ PCR products ทั้งหมด ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 2  $\mu$ l ไป run ใน 1% agarose gel electrophoresis ที่ 70 volts เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
- 5) purify PCR products โดยการ ใช้ PCR purification kit (QIAGEN) ตามขั้นตอน ของ PCR purification kit
- 6) นำ PCR products ที่ purify แล้ว ปริมาตร 2  $\mu$ l ผสมกับ 6X loading dye ไป run ใน 1% agarose gel electrophoresis ที่ 70 volts เพื่อตรวจสอบว่าได้ PCR products ที่บริสุทธิ์
- 7) นำ PCR product ปริมาตร 5  $\mu$ l ไปทำ SSCP เพื่อทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ ผิดปกติไปทำ DNA sequencing
- 8) ส่ง PCR products ของผู้ป่วยที่สงสัย ที่ purify แล้ว ปริมาตร 15  $\mu$ l ไปที่ BioService Unit (BSU) เพื่อทำ automated sequencing ในรายที่มีผล SSCP มี band shift จากคน ปกติ
- 9) อ่านผล sequence ที่ได้เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของลำดับเบส \* โดยการ อ้างอิงจาก Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) [gi:51511463]

### ขั้นที่ 3 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ด้วยเทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

- 1) นำ 1X buffer ปริมาณ 1,000 ml แช่เย็นทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน
- 2) นำกระจก 2 อัน ซึ่งมีขนาดยาวกับสั้น มาทำเช็ดด้วย 95% Ethanol ทิ้งไว้ ประมาณ 15 นาที ช่วงระหว่างรอควรไปเตรียมพอลิเอคริลาไมด์เจล
- 3) เตรียม 15% พอลิเอคริลาไมด์เจล โดยใช้ 40% polyacrylamide gel Stock 1.875 ml, 10X TBE 0.5 ml, glycerol 0.3 ml, และเติมน้ำ 2.625 ml
- 4) นำส่วนของพอลิเอคริลาไมด์เจลที่เตรียมแล้วเติม APS 50  $\mu$ l และ Temed 5  $\mu$ l เขย่าให้เข้ากันและเทใส่ในช่องว่างระหว่างกระจก หลังจากนั้นนำ comb มาเสียบพร้อมทั้งใช้ คลิปหนีบไว้ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง
- 5) นำกระจกที่ set เจลแล้ว ไปใส่เครื่องที่จะทำการรัน ใช้ 1X buffer ที่แช่เย็นไว้เติม ลงในเครื่องรันเจล และนำเครื่องรันเจลใส่ไว้ในตู้เย็น (4 °C) เพื่อไม่ให้เกิดความร้อน ทำการ Pre-run 10 นาที ระหว่างนี้เตรียม product ไว้

6) นำ PCR product ทั้งหมดมาเติมสี SSCP และ 10% SDS อัตราส่วน 8:16:16 ตามลำดับ และต้องมี product ที่เป็น double strand เพื่อใช้รันในแต่ละ exon ด้วย แต่ double strand และ 100 bp Ladder จะไม่นำมาทำ denature และนำ PCR ที่ผสมสีแล้วไป denature ที่ 95 °C ประมาณ 15-20 นาที

7) นำ product ทั้งหมด load ลงในเจล โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 200 V นาน 3-5 ชั่วโมง

8) นำเจลที่ run แล้วถอดกระจกสีออก ในกระจกยาวที่มีเจลติดอยู่ ให้นำเจลมา ย้อมในสี cyber green ประมาณ 15-20 นาที

9) นำเจลออกไปถ่ายรูป เพื่อดูความผิดปกติ

#### ขั้นที่ 4 การตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วย sequencing analysis

1) ขั้นเตรียมดีเอ็นเอ (PCR product)

นำ PCR product ของผู้ป่วยที่พบว่ามีความผิดปกติ เปลี่ยนไปมาทำการ purify โดยใช้ QiAgent kit

2) ขั้นตอนการทำ DNA sequencing มีดังนี้

นำ product ที่ได้ มาทำการหาลำดับเบสด้วยการทำ sequencing cycle โดยใช้ primer ของ exon ที่มีความผิดปกติ และ BigDye terminator Version 3.0 (PE Biosystems, CA) จากนั้นอ่านผลด้วย ABIPRISM™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus, Branchburg, New Jersey) หลังจากนั้น วิเคราะห์ผลโดยดูผลการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส

**ขั้นที่ 5 การพิสูจน์ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ได้จากผลของ Sequencing เป็นการกลายพันธุ์หรือโพลิมอร์ฟิซึมด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

อันดับแรก ต้องนำตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสนั้นไปตรวจสอบในเว็บ [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) ว่ามีรายงานโพลิมอร์ฟิซึมในตำแหน่งนั้นหรือไม่ ถ้ายังไม่มีรายงานก็ใช้วิธี RFLP ในการตรวจสอบ โดยจะทำการตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส เปรียบเทียบกับคนปกติที่ไม่ได้มีอาการของไหลตายและคลื่นไฟฟ้าหัวใจตรวจไม่พบ Brugada syndrome (control) จำนวน 50 คน ถ้าผลการตัดสาย ดีเอ็นเอในคนปกติต่างกัน แสดงว่า ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเป็นการกลายพันธุ์แน่นอน

### 3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยจะทำการรวบรวมข้อมูล และเก็บบันทึก บน Data Sheet เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หา band ของผู้ป่วยที่มีความแตกต่างจากคนปกติ (control) จากขบวนการ SSCP แล้วนำส่งหาลำดับเบส (Sequencing) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลที่ได้ว่ามีตำแหน่งเบสใดบ้างของยีน *SCN5A* ที่แตกต่างจาก Human genome Database ([gi:51511463]) ถ้ามีเบสเปลี่ยนไป จะตรวจสอบว่าแปลรหัสให้กรดอะมิโนที่แตกต่างไปจากเดิมหรือไม่ ถ้าแตกต่างแสดงว่า อาจเป็นการกลายพันธุ์

วิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ (mutation) โดยทำ RFLP ซึ่งทำการหา enzyme ที่จะทำการตัดสายของดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเปรียบเทียบกับคนปกติที่ไม่ได้มีอาการของไหลตายและคลื่นไฟฟ้าหัวใจตรวจไม่พบ Brugada syndrome (control) จำนวน 50 คน ถ้าผลการตัดสายดีเอ็นเอในคนปกติไม่สามารถตัดได้ แสดงว่า ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเป็นการกลายพันธุ์ หากพบว่าสามารถตัดได้ในคนปกติ แสดงว่า ตำแหน่งนั้นเป็น polymorphism

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาตรวจสอบว่าในตำแหน่งที่มีเบสเปลี่ยนนั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของ sodium channel ของหัวใจซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหลตายอย่างไร

## บทที่ 4

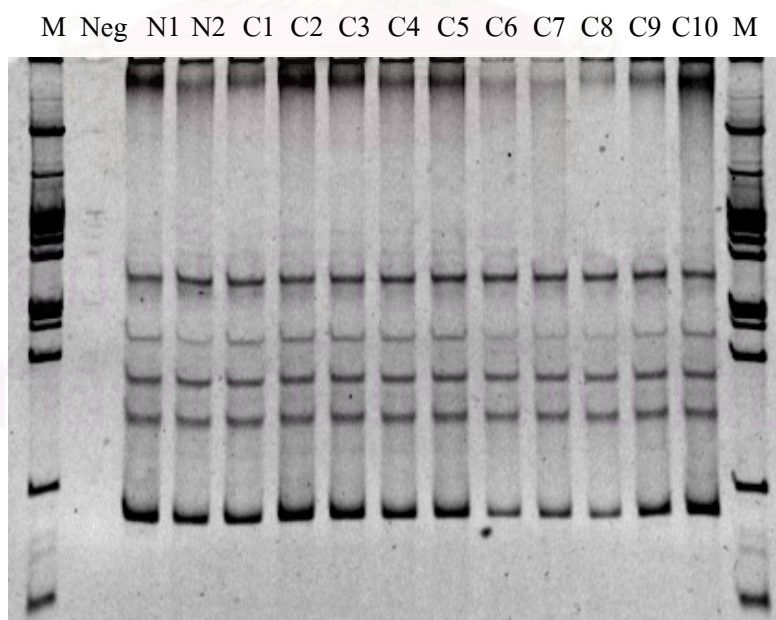
### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *SCN5A* โดย SSCP

จากรายงานที่ได้รายงานไว้เกี่ยวกับตำแหน่งการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* พบว่ามักเกิดขึ้นในบริเวณอินเทอร์เซกเมนต์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ในบริเวณอินเทอร์เซกเมนต์ของยีน *SCN5A* ซึ่งเป็นส่วนของ exon 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 26 และ 28 โดยการใช้วิธี SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ตรวจหาในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายทั้งหมด 10 ราย เทียบกับคนปกติ 2 ราย พบว่า exon 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 26 ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากคนปกติ แต่ exon 28 ช่วงที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น ซึ่งผลของการวิเคราะห์แต่ละ exon ในการวิจัย เป็นดังนี้

##### 1. Exon 1

ใน exon 1 พบว่า กลุ่มผู้รอดชีวิตจากโหลตตายทั้ง 10 ราย มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



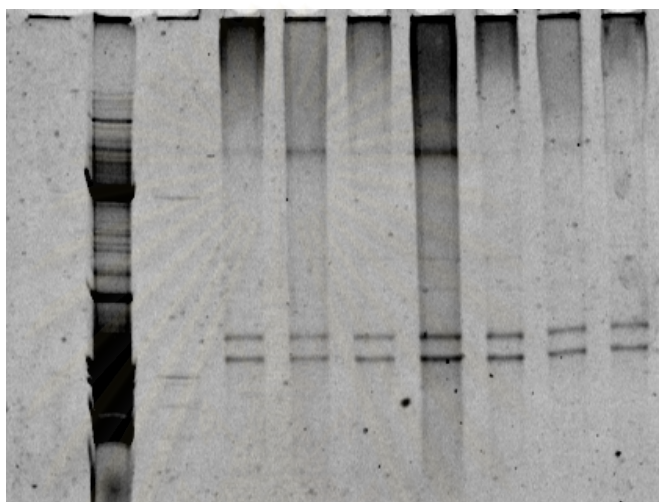
รูปที่ 8 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 1 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)



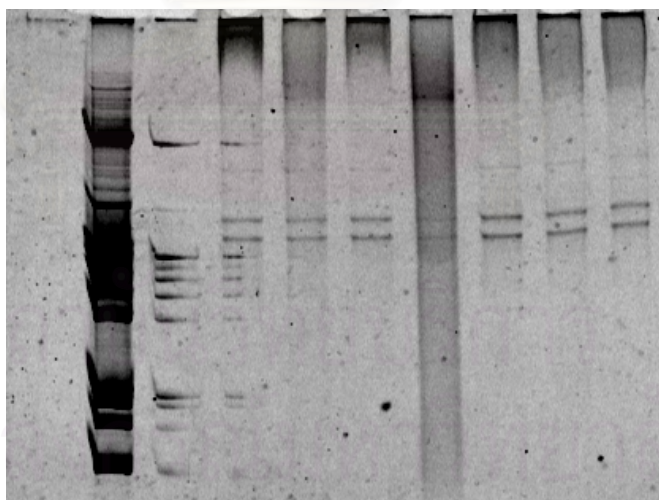
## 2. Exon 2

ใน exon 2 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

M Neg N1 N2 C1 C2 C3 C4 C5



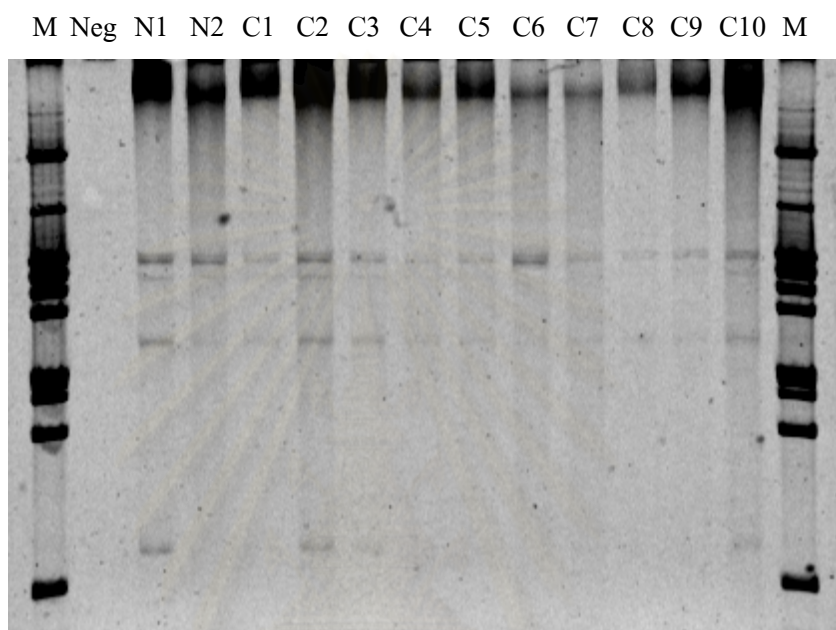
M Neg N1 N2 C6 C7 C8 C9 C10



**รูปที่ 9** แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 2 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

### 3. Exon 3

ใน exon 3 พบว่า กลุ่มผู้รอดชีวิตจากโหลตายทั้ง 10 ราย มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



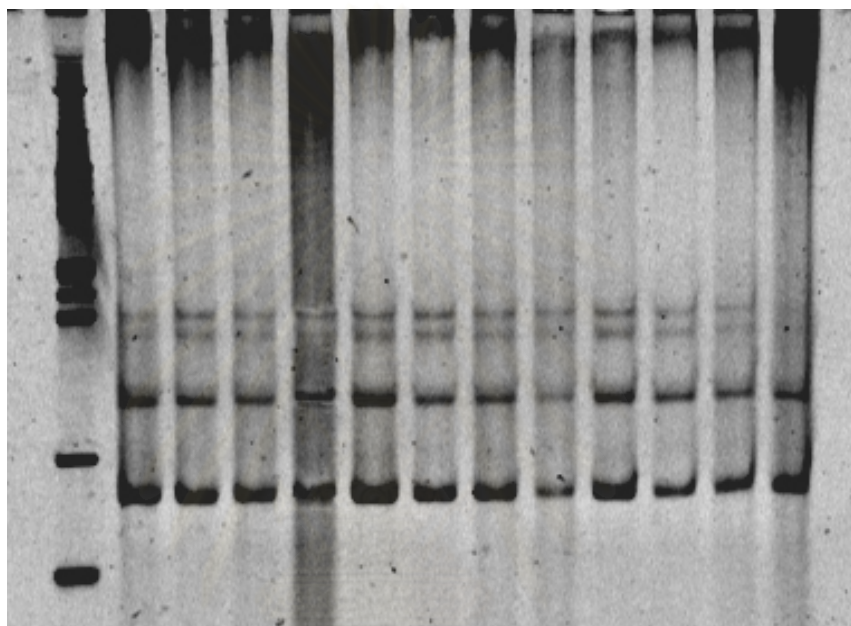
รูปที่ 10 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 3 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4. Exon 8

ใน exon 8 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

Neg M N1 N2 C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10

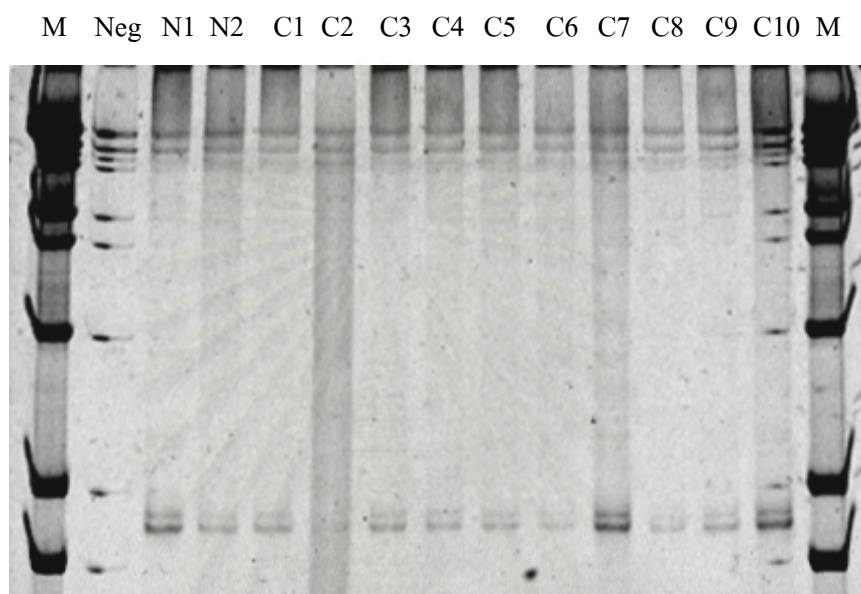


รูปที่ 11 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 8 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 5. Exon 11

ใน exon 11 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



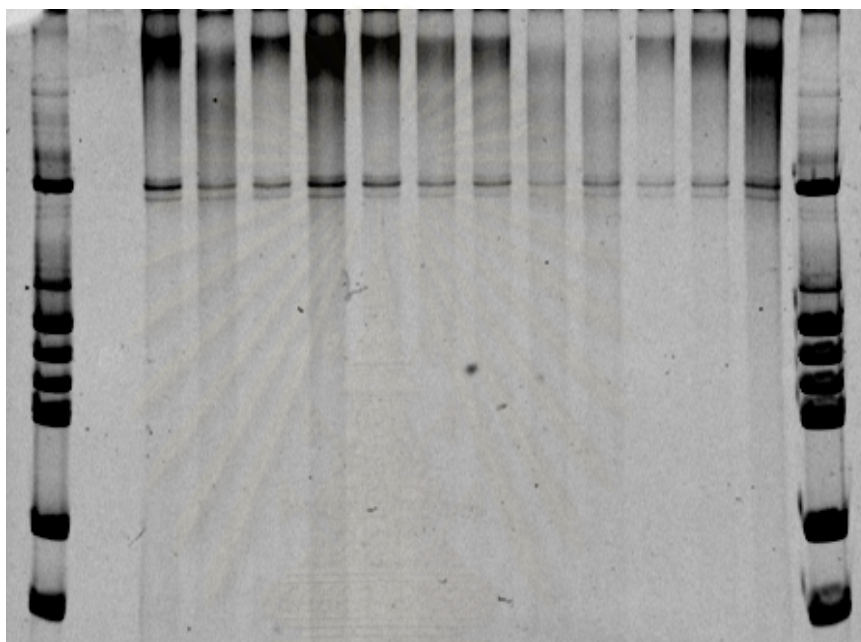
รูปที่ 12 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 11 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 6. Exon 12-1

ใน exon 12-1 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

M Neg N1 N2 C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 M

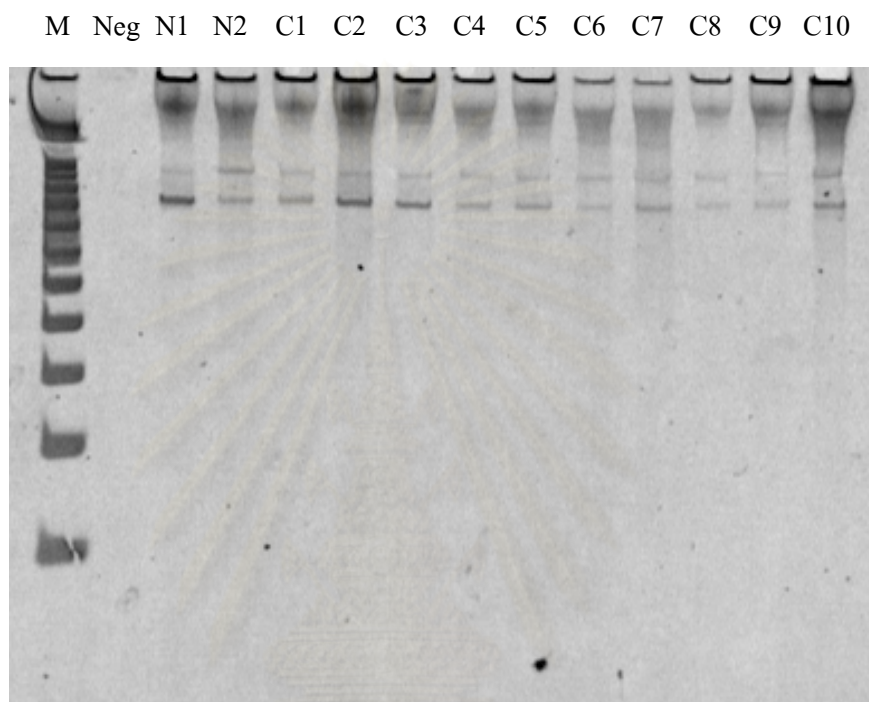


รูปที่ 13 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 12-1 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 7. Exon 12-2

ใน exon 12-2 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

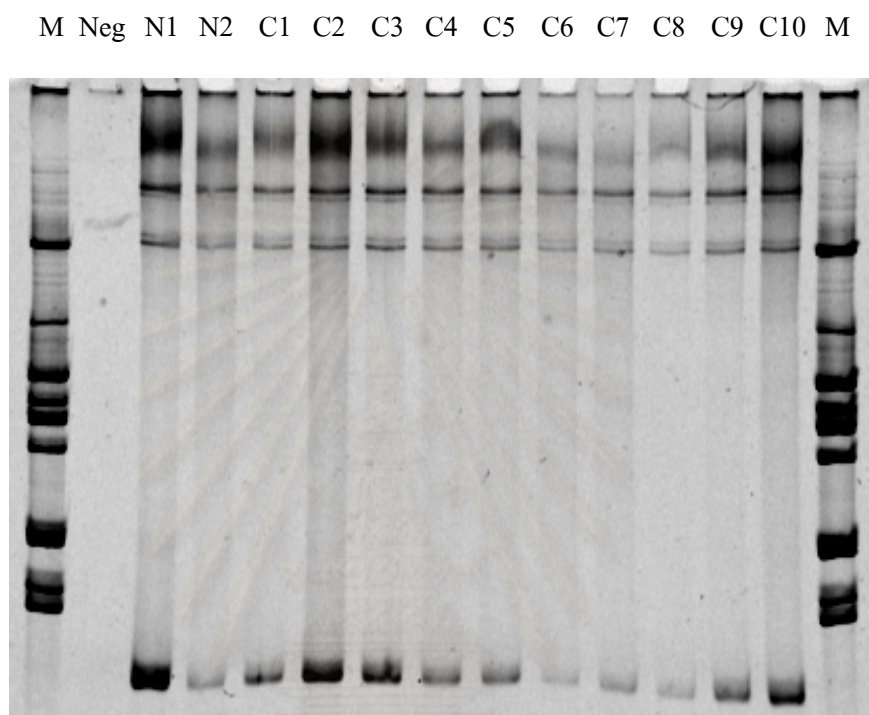


รูปที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 12-2 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 8. Exon 13

ใน exon 13 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

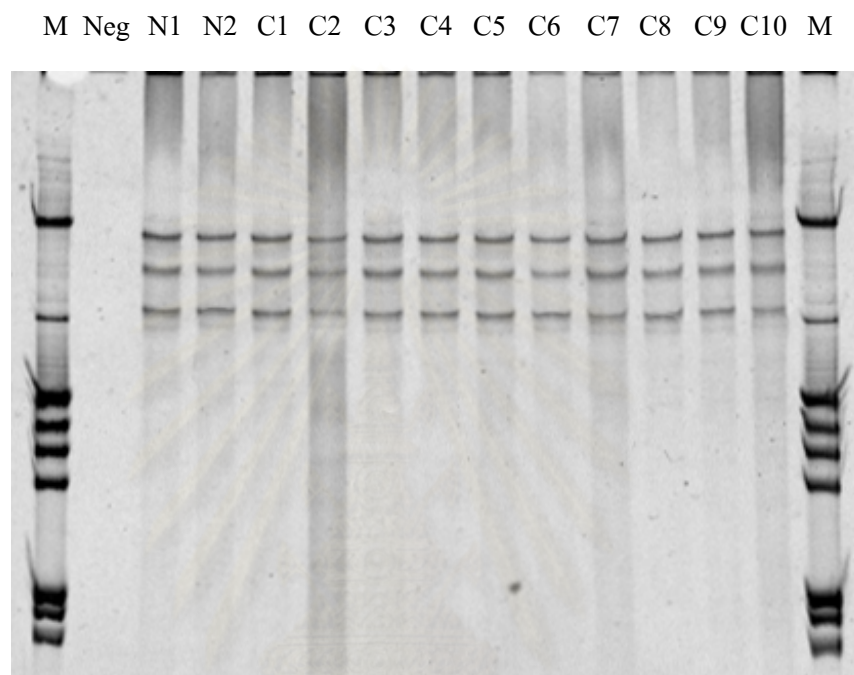


รูปที่ 15 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 13 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันนวัตยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 9. Exon 17-1

ใน exon 17-1 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



รูปที่ 16 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 17-1 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

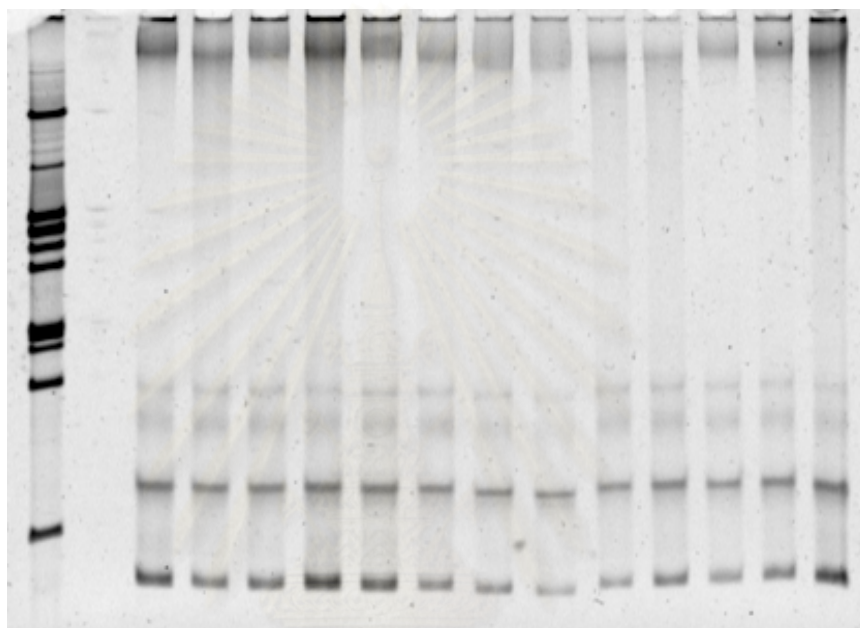
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 10. Exon 17-2

ใน exon 17-2 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

M Neg N1 N2 C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 M

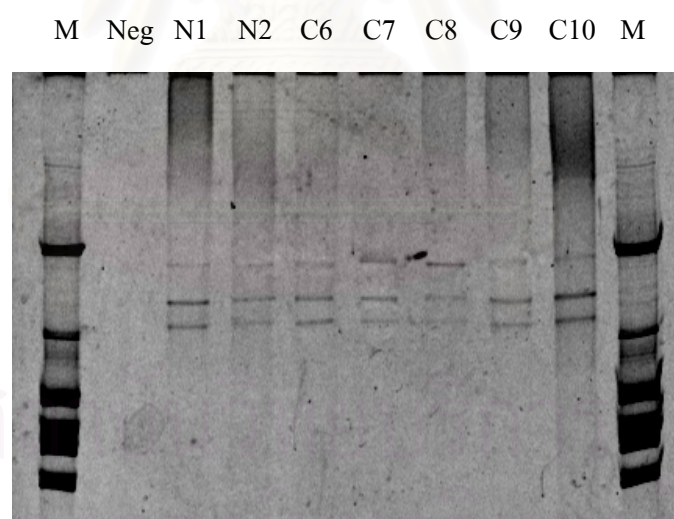
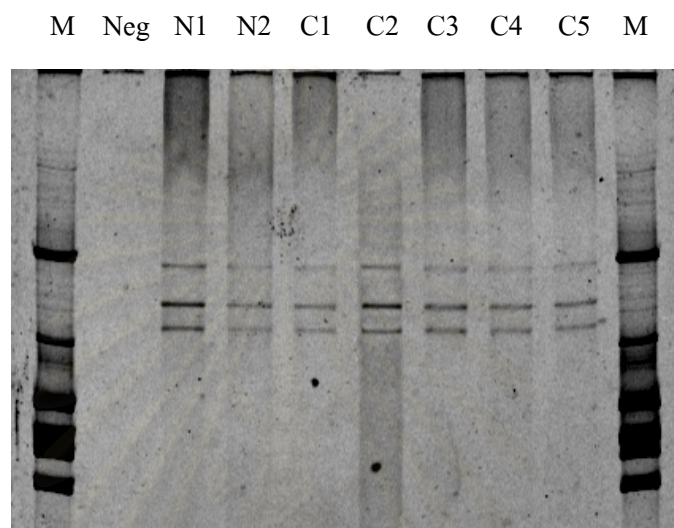


รูปที่ 17 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 17-2 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 11. Exon 18

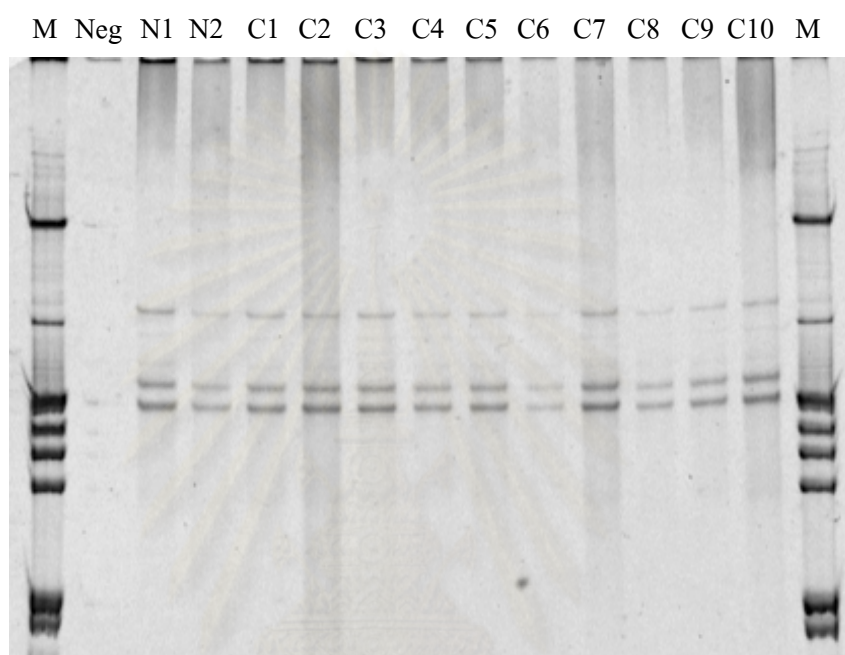
ใน exon 18 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



รูปที่ 18 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 18 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

## 12. Exon 19

ใน exon 19 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

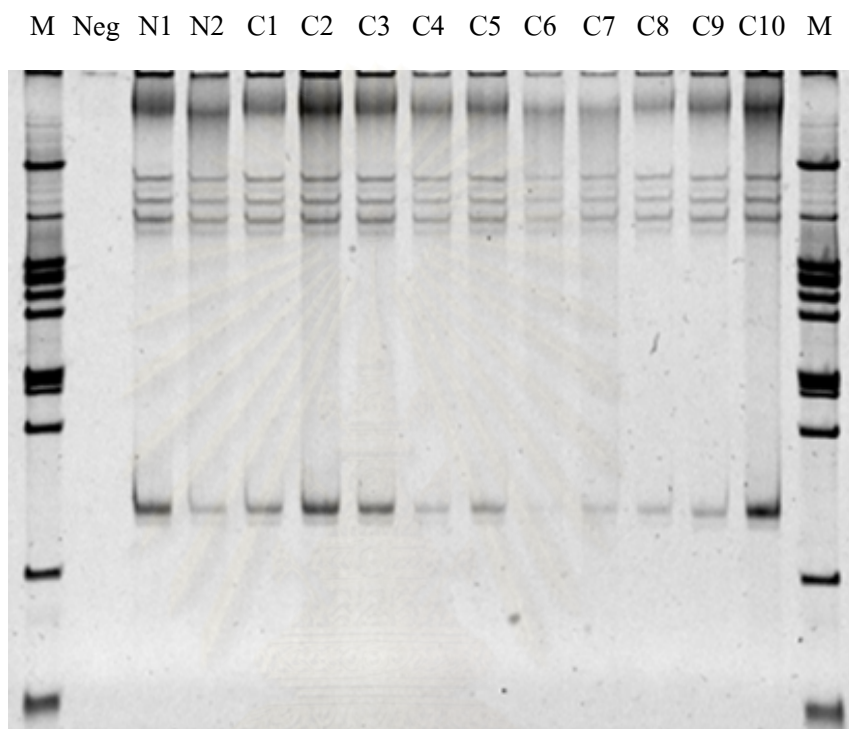


**รูปที่ 19** แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 19 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 13. Exon 26

ใน exon 26 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



รูปที่ 20 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 26 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 14. Exon 28-3

ใน exon 28 ส่วนที่ 3 พบว่า มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 3 แบบ ดังรูป



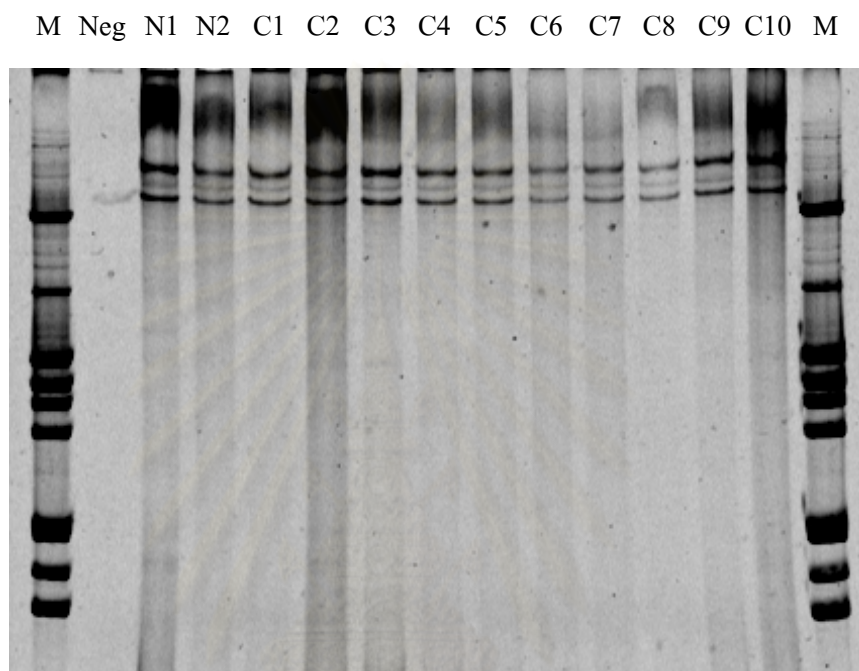
รูปที่ 21 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 28-3 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) และ  
ผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP

(M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**15. Exon 28-4**

ใน exon 28-4 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป

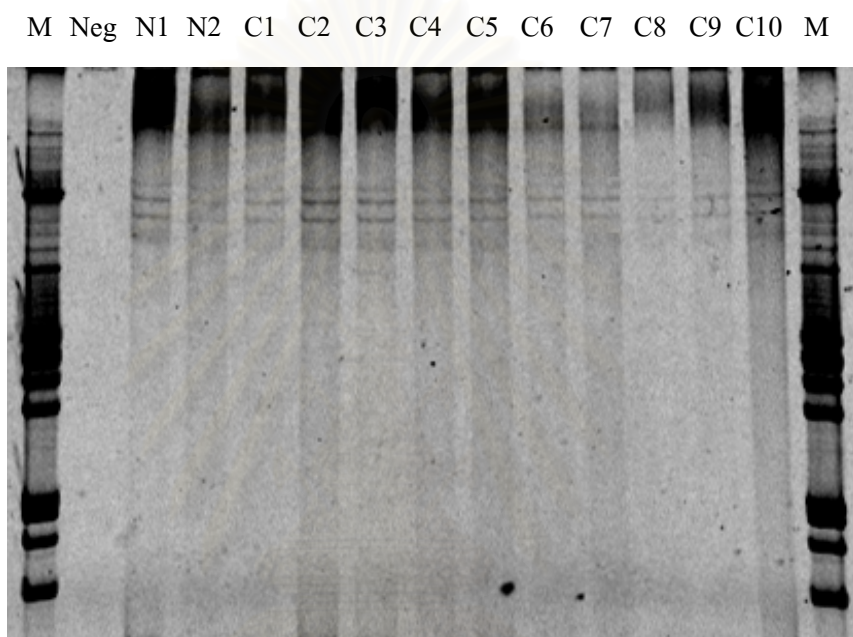


รูปที่ 22 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 28-4 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 16. Exon 28-5

ใน exon 28-5 พบว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีความแตกต่างจากคนปกติ แสดงว่า ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังรูป



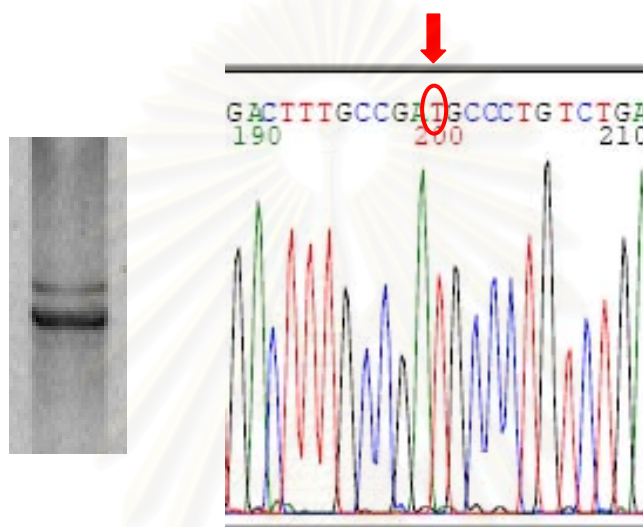
รูปที่ 23 แสดงแถบดีเอ็นเอของ exon 28-5 ในยีน *SCN5A* ของคนปกติ (N1-N2) เปรียบเทียบกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย (C1-C10) โดยใช้เทคนิค SSCP (M = marker, Neg = negative control)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.2 การหาลำดับเบส (Sequencing)

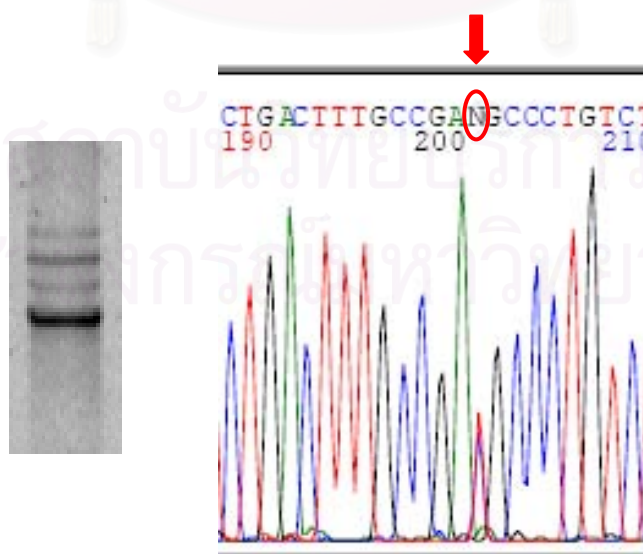
หลังจากที่วิเคราะห์ผลที่ได้จากวิธีการ SSCP แล้ว ได้ทำการส่งดีเอ็นเอของ N1, C5 และ C6 ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่พบใน exon 28-3 ไปหาลำดับเบส (Sequencing) พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 แบบที่แตกต่างกันนั้นก็มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่แตกต่างด้วยเช่นกัน ดังนี้

1. แบบที่ 1 พบว่า มีลำดับเบสเป็น T ทั้ง 2 alleles เหมือนกับ Genbank ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงลำดับเบสของคนปกติ (N1) ของ exon 28 ช่วงที่ 3

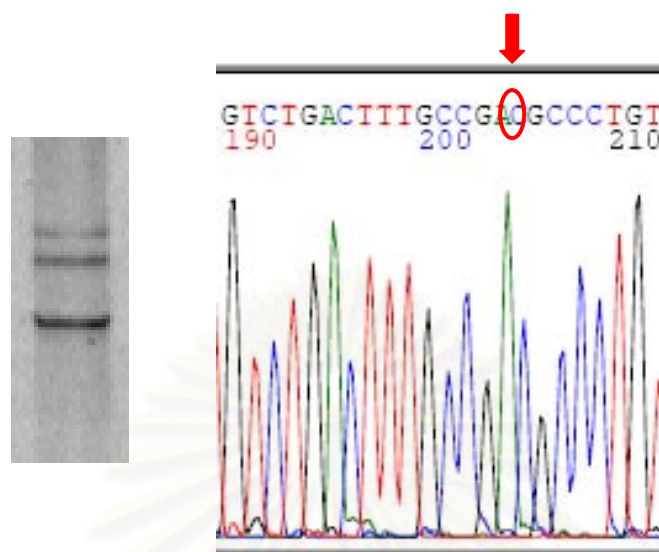
2. แบบที่ 2 พบว่า มีลำดับเบสเป็น T 1 allele และ C 1 allele ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 แสดงลำดับเบสของคนที่รอดตายจากไหลตาย (C5) ของ exon 28 ช่วงที่ 3



3. แบบที่ 3 พบว่า มีลำดับเบสเป็น C ทั้ง 2 alleles ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 แสดงลำดับเบสของคนที่รอดตายจากโหลตาย (C6) ของ exon 28 ช่วงที่ 3

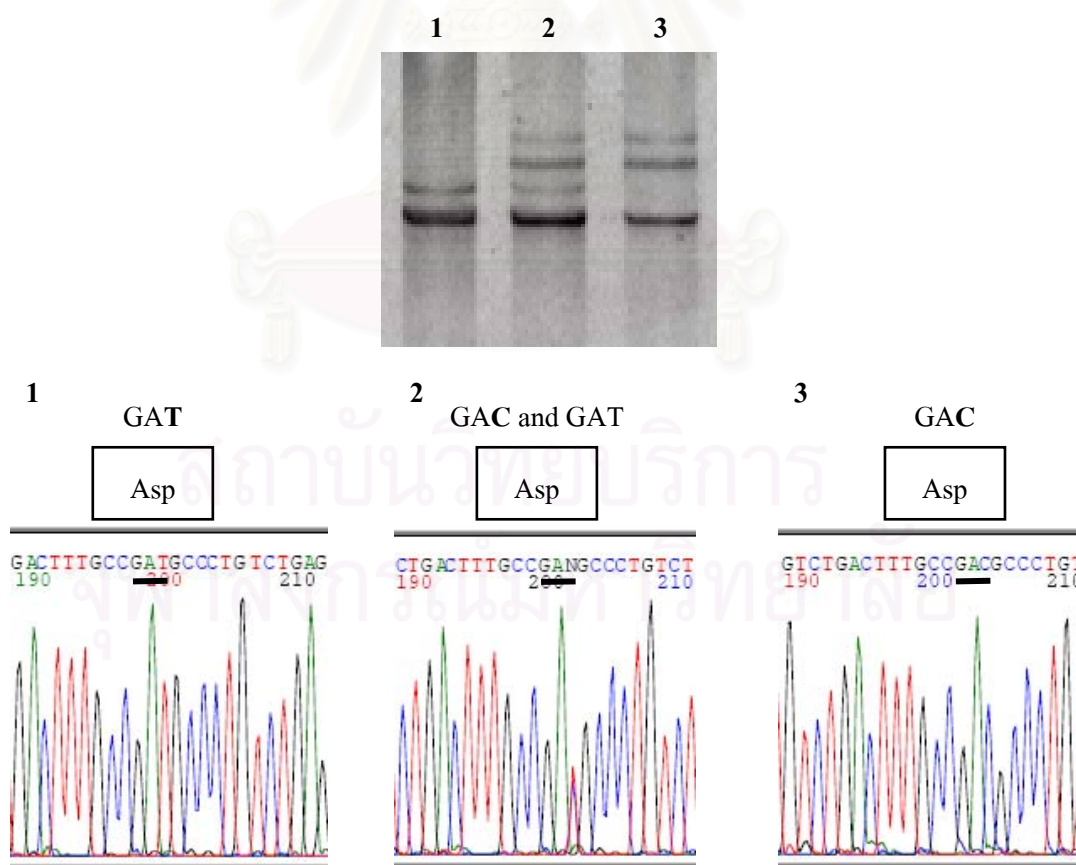
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 ผลการเปรียบเทียบ

เมื่อนำรูปแบบที่ได้จากเทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ทั้ง 3 แบบมาศึกษา พบว่า แบบที่ 1 เป็นของคนปกติ (Normal control) เมื่ออ่านลำดับเบสจะได้เป็น GAT ซึ่งจะแปลรหัสออกมาได้เป็นกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1818 ที่มีชื่อว่า Asp (Aspartic acid) ซึ่งแบบที่ 2 และ 3 แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก T ไปเป็น C 1 allele และ 2 alleles ตามลำดับก็ตาม แต่เมื่อแปลรหัสออกมาก็จะได้กรดอะมิโนที่มีชื่อว่า Asp (Aspartic acid) เช่นเดียวกัน หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการค้นหาข้อมูลจากเว็บไซต์เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าว พบว่า มีรายงานการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งนั้นไว้บ้างแล้ว\* ดังนั้น ในตำแหน่งนี้ไม่ใช่การกลายพันธุ์ (mutation) แต่เป็น polymorphism ดังรูป \* เว็บไซต์ [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) NM\_198056 และ NM\_000335



รูปที่ 27 แสดงผลการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 แบบกับลำดับเบส

## 5.2 ผลการวิเคราะห์ปัจจัย

จากรูปที่ 27 แสดงให้เห็นว่า วิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) สามารถบ่งบอกรูปแบบของ polymorphism ได้ทั้งหมด 3 แบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบก็แตกต่างกันไป ทั้งนี้เนื่องมาจาก ดีเอ็นเอของแต่ละคนที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสเกิดขึ้น เมื่อนำเทคนิค SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) เข้ามาทำการศึกษาหาความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้น ในช่วงของขบวนการแยกสายดีเอ็นเอ (denature) และการแช่เย็นจัด (Shock) เพื่อป้องกันไม่ให้ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวกลับมาจับกันใหม่นั้น ดีเอ็นเอแต่ละสายก็จะมีการขดตัวให้รูปแบบที่แตกต่างกันไป ซึ่งเมื่อนำมารันบนเจลก็จะทำให้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เหมือนกันแสดงรูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปด้วย ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้น ถ้าหากใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนอื่น ๆ ที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของโรคโหลตายก็สามารถทำได้เช่นเดียวกัน

## 5.3 อภิปรายผลการวิจัย

การหาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายทั้งสิ้น 10 ราย ตามที่มีรายงานถึงสาเหตุที่ทำให้เกิด Brugada syndrome ว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณอินเตอร์เซกเมนต์ของยีน SCN5A ซึ่งเป็นส่วนของ exon 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 26 และ 28 เมื่อได้ทำการตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี SSCP ผลปรากฏว่าไม่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าว พบเพียงแต่ polymorphism ในบริเวณ exon 28 ช่วงที่ 3 เท่านั้น ซึ่งความเป็นไปได้ที่เกิดขึ้นคือ

1. อาจเกิดจากยังตรวจหาการกลายพันธุ์ไม่ทั่วยีน ซึ่งถ้ายีน SCN5A เป็นยีนที่ทำให้เกิดโรคโหลตายจริง ก็อาจเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์ในยีนนี้อาจจะเป็นบริเวณอื่นนอกเหนือจากที่เคยมีรายงานไว้ใน Brugada Syndrome (บริเวณ intersegment)
2. การกลายพันธุ์ของโรคโหลตายในยีน SCN5A ไม่จำเป็นต้องเหมือนกับใน Brugada syndrome เพราะถ้าจะพิจารณาจากการกลายพันธุ์ของ Brugada syndrome ในบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์บ่อย ๆ เช่น ในบริเวณ exon 28 ซึ่งตรวจพบ T1620M, Y1795H, A1924T, S1710L ซึ่งคาดว่าน่าจะเจอในโหลตายเช่นเดียวกัน แต่กลับไม่เจอการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเลย แม้แต่การเป็น polymorphism ก็ตาม

#### 5.4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่พบ polymorphism ในตำแหน่งของลำดับเบสที่ 5454 ซึ่งมีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงจาก T ไปเป็น C (1818 Asp) ซึ่งพบว่า Allele frequency ของผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโรคหัวใจที่มีอาการบรูคาดาจำนวน 10 ราย พบ Allele frequency ของ T และ C เท่ากับ 0.55 และ 0.45 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Entrez SNP ของ [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) หมายเลข rs17215486 ซึ่งแสดงข้อมูล Allele frequency ของคนต่างชาติ ซึ่งมี T และ C เท่ากับ 0.933 และ 0.067 ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างกันมาก ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการที่จะศึกษาหา Allele frequency ของตำแหน่งดังกล่าวในคนไทยที่ปกติ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในตำแหน่งดังกล่าวของยีน *SCN5A* และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างกับข้อมูลใน Database ต่อไป

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน *SCN5A* ไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจตาย น่าจะเป็น ion channel ตัวอื่นที่อาจทำให้เกิดโรคหัวใจตายได้ เช่น *HERG*, *KVLQT1* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิด Long QT syndrome และยังมี *KCNA4*, *KCNA5*, *KCNB1*,  $\beta$  subunit ของยีน *SCN5A*, ยีนที่เกี่ยวข้องกับ Calcium channel หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับ Na-K exchange channel ซึ่งสามารถทำการศึกษาต่อไปเพื่อที่จะได้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของโรคหัวใจตายต่อไปได้

## รายการอ้างอิง

1. Tatsanavivat P, Chirawakul A, Klungboonkrog V, Chaisiri S, Jarentanyaruk L, Munger RG, et al. Sudden and unexplained death in sleep (Lai-Tai) of young men rural north Thailand. Int J Epidemiol 1992;21:904-910
2. Nademanee K, Veerakul G, Nimmannit S, Chouwakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K, et al. Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. Circulation 1997;96:2595-2600
3. Tungsanga K and Sriboonlue P. Sudden unexplained death syndrome in north-east Thailand. Int J Epidemiol 1993;22:81-87
4. อรพรรณ เมฆาคิลกกุล และคณะ. โรคไหลตาย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ทองสุกศึกษาและสมาคมแพทย์อาชีวเวชศาสตร์และสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย 2536; 1-25
5. ปิยทัศน์ ทัศนาวินันต์. โรคไหลตาย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พี.บี. ฟอเรนส์บุ๊ก เซนเตอร์ 2540; 29-44
6. Goh KT, Chao TC, Heng BH, Koo CC. Epidemiology of sudden unexpected death syndrome among Thai workers in Singapore. Int J Epidemiol, 1993;22:88-95
7. Araki T, Konno T, Itoh H, Ino H, Shimizu M. Brugada syndrome with ventricular tachycardia and fibrillation relates to hypokalemia. Circ J 2003;67(1):93-5
8. Robert R, Brugada R. Genetics and arrhythmias. Annu Rev Med 2003;54:257-67
9. Priori S, Napolitano C, Terreni L, et al. Incomplete penetrance and variable response to sodium channel blockade in the right bundle branch block and ST segment elevation syndrome. PACE 1999;22:713
10. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. J Am Coll Cardiol 1992;20:1391-6
11. Remme Ca, Wever EF, Wilde AA, Derksen R, Hauer RN. Diagnosis and long-term follow-up of the Brugada syndrome in patients with idiopathic ventricular fibrillation. Eur Heart J 2001;22(5):400-9

12. Riera ARP, Ferreira C, Schapachnik E, Sanches PC, Moffa PJ. Brugada syndrome with atypical ECG : Downsloping ST-segment elevation in inferior leads. Journal of Electrocardiology 2004;37(2):101-4
13. Boersma LV, Jaarsma W, Jessurun ER, Van Hemel NH, Wever EF. Brugada syndrome: a case report of monomorphic ventricular tachycardia. Pacing Clin Electrophysiol 2001;24(1):112-5
14. Bjerregaard P, Gussak, Antzelevitch C. The enigmatic manifestation of Brugada syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol 1998;9:109-11
15. Veerakul G, Nademanee K. What is the sudden death syndrome in Southeast Asia males?. Cardiology in review 2000;8:90-5
16. Brauwald E, Zipes DP, Lippy P. Sudden cardiac death. In Heart disease. W.B. Saunders co 2001.865
17. Gussak I, Antzelevitch C, Bjerregaard P, Towbin JA, Chaitman BR. The Brugada syndrome: Clinical, Electrophysiologic and Genetic aspects. J Am Coll Cardiol 1999;33(1):5-15
18. Silvia G, Napolitano P, Napolitano C. Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. Science 2004;1015:96-110
19. Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, et al. Genetic and biophysical basis of Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. Human Molecular Genetics 2002;11(3):337-345
20. Moric E, Herbert E, Trusz-Gluza M, Filipecki A, Mazurek U, Wilczok T. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (*SCN5A*). Europace 2003;5:325-334
21. Herfst LJ, Rook MB, Jongasma HJ. Trafficking and functional expression of cardiac Na<sup>+</sup> channels. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2004;36:185-193
22. Futterman LG, Lemberg L. Brugada. Am J Crit Care 2001;10:360-4
23. Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, Angelilli A, Villanueva F, McNamara DM, London B. Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. Circulation 2002;105(6):707-13
24. Kurita T, Shimizu W, Inagaki M, Suyama K, Taguchi A, Satomi K, Aihara N, Kamakura S, Kobayashi J, Kosakai Y. The electrophysiologic mechanism of ST-segment elevation in Brugada syndrome. J Am Coll Cardiol 2002 ;40(2):330-4

25. Hong K, Berruezo-sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, et al. Phenotype characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a Sudden Unexpected Death Syndrome mutation in *SCN5A*: Female predominance in the signs and symptoms of the disease. J Cardiovasc Electr 2004;15(1):64-69
26. Schulze-Bahr E, Eckardt L, Breithardt G, Seidl K, Wichter T, et al. Sodium channel gene (*SCN5A*) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: Different Incidences in familial and Sporadic disease. Hum Mutat. 2003;21(6):651-2
27. McNair WP, Ku L, Taylor MRG, Fain PR, Dao D, et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. Circulation 2004;110:2163-2167
28. Niinura H, Matsunaga A, Kumagai K, et al. Genetic analysis of Brugada syndrome in Western Japan: Two novel mutation. Cir J 2004;68:740-6
29. Munger RG. Sudden death in sleep of Loatian-Hmong refugees in Thailand: a case control study. Am J Public Health 1987;77:1187-90
30. Pollanen MS, Chiasson DA, Cairns J and Yong JG. Sudden unexplained death in Asian immigrants : recognition of a syndrome in metropolitan Totonto. CMAJ 1996;155:537-40
31. Sangwatanaroj S, Preechawat S, Sunsaneewittayakul B, Sitthisook S, Tosukhowong P, and Tungsanga K. Right ventricular electrocardiographic leads for detection of brugada syndrome in sudden unexplained death syndrome survivors and their relatives. Clin cardiol 2001;24
32. Nimmamit S, Malasit P, Chaovakul V, Susengrat W, Vasuvattakul S and Nilwarangkur S. Pathogenesis of sudden unexplained death nocturnal death (LAITAI) and endemic distal renal tubular acidosis. Lancet 1991;338:930-2
33. Sriboolue P, Prasongwattana V, Suwantrai S, Bovornpadungkitti S, Tungsnga K and Tosukhowong P. Potassium contents of Northeastern Thai foods. J Med Assoc Thai 1998;81:616-26
34. Tosukhowong P, Tungsanga K, Srisakul C, Prapunwattana P, Sitpraja V, Sriboonlue P, et al. Potassium status of Northeast Thai constructors in the different geographic locations. J Med Assoc Thai 2001;84:163-9
35. Sriboolue P, Prasongwattana V, Suwantrai S, Bovornpadungkitti S, Tungsnga K and Tosukhowong P. Nutritional potassium status of healthy adult males residing in the rural northeast Thailand. J Med Assoc Thai 1998;81:223-32

36. Sangwatanaroj S, Tungsanga K, Tatsanavivat P, Seidman JG, Seidman CE. Familial sudden unexplained death syndrome (SUDS) ; and X linked recessive disorder. Asian Heart J 1998;6:49
37. Tatsanavivat P, Chirawatkul A, Klungboonkrong V, Chaisiri S and Saowakonhas. Familial clustering of presumptive Sudden Unexplained Death Syndrome (PSUDS). Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991;22:195-9
38. Corrado D, Buja G, Basso C, Nova A and Thiene G. What is Brugada syndrome ?. Cardiol Review 1999;7:191-4
39. Naccarelli GV and Antzelevitch C. The Brugada syndrome : clinical, genetics, cellular and molecular abnormalities. Am J med 2001;110:573-81
40. ราตรี สุกทรวง. ประสาทสรีรวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1984 กรุงเทพมหานคร
41. Grant AO. Molecular biology of sodium channels and their role in Cardiac arrhythmias. Am J Med 2001;110:296-305
42. Postma AV, Bessina CR, De Vries JF, Wilde AA, Moorman AF, Mannens MM. Genomic organization and chromosomal localization of two members of the KCND ion channel family, *KCND2* and *KCND3*. Human Genet 2000;106:614-9
43. Hong K, Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Ohe T, Brugada R. Brugada syndrome: 12 Years of Progression. Acta Med 2004;58:255-261
44. Matsuo K, Akahoshi M, Nakashima E, et al. The prevalence, Incidence and Prognostic value of the Brugada-type electrocardiogram. J Am Coll Cardiol 2001;38(3):765-70
45. Sangwatanaroj S, Prechawat S, Sunsaneewitayakul B, Sitthisook S, Tosukhowong P, Tungsanga K. New electrocardiographic leads and the procainamide test for the detection of the Brugada sign in sudden unexplained death syndrome survivors and their relatives. Eur Heart J 2001;22(24):2290-96
46. Huang MH, Marcus FI. Idiopathic Brugada-type electrocardiographic pattern in an Octogenarian. Journal of electrocardiology 2004;37(2):109-11
47. Sangwatanaroj S, Ngamchareon C, Prechawat S. Pattern of inheritance in three Sudden Unexplained Death syndrome (Lai Tai) families. J Med Assoc Thai 2001;84:443-451
48. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. Nature 1999;392:293-296



49. Wang DW, Makita N, Kitabatake A, Balser JR, George AL. Enhance Na<sup>+</sup> channel intermediate inactivation in Brugada syndrome. Circ Res 2000;87:37-43
50. Baroudi G, Cubonnan E, Pouliot V, Chalaine M. *SCN5A* mutation (T1620M) causing Brugada syndrome exhibits different phenotype when expressed in *Xenopus* oocytes and mammary cells. FEBS Lett 2000;467:12-16
51. Wan X, Wang Q, Kirsh GE. Functional suppression of sodium channel by beta (1)-subunits as a molecular mechanism of idiopathic ventricular fibrillation. J Mol Cell Cardiol 2000;32:1873-84
52. Deschenes I, Baroudi G, Berthet M, et al. Electrophysiological characterization of *SCN5A* mutations causing long QT (E1784K) and Brugada (R1512W and R1432G) syndromes. Cardiovas Res 2000;87:37-43
53. Rook MB, Alshinawi CB, Geoenewegen WA, et al. Human *SCN5A* gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. Cardiovas Res 1999;44:507-17
54. Baroudi G, Pouliot V, Denjoy I, Guicheney P, Shrier A, Chahine M. Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an *SCN5A* mutant (R1432G). Circ Res 2001;88:78-83
55. Bezzina C, Veldkamp MW, Van Den Berg MP, et al. A single Na<sup>+</sup> channel mutation causing both Long-QT and Brugada syndrome. Circ Res 1999;85:1206-13
56. Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Bartscheer A, Wilde AA, Balser JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by multidisfunctional Na<sup>+</sup> channel. Circ Res 2000;86:91-97
57. Kyndt F, Probst V, Potet F, et al. Novel *SCN5A* mutation leading to either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. Circulation 2001;104:3081-6
58. Wang DW, Viswanathan PC, Balser JR, George AL, Benson DW. Clinical, genetic and biophysical characterization of *SCN5A* mutations associated with atrioventricular conduction block. Circulation 2002;105:341-46
59. Levy-Nissenbaum E, Eldar M, Wang Q, et al. Genetic analysis of Brugada syndrome in Israel: two novel mutations and possible genetic heterogeneity. Genetic Testing 2001;5:331-34
60. Vatta M, Dumaine R, Antzelevitch C, et al. Novel mutation in domain I of *SCN5A* cause Brugada syndrome. Gen and Metb 2002;75:317-24

61. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, et al. Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: a prospective evaluation of 52 families. Circulation 2000;1022:509-15
62. Akai J, Makita N, Sakurada H, et al. A novel *SCN5A* mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation with uot ECG finding of Brugada syndrome. FEBS Lett 2000;479:29-34



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. Lysis Buffer I

Sucrose	109.54 g
1.0 M Tris-HCl	10.0 ml
1.0 M MgCl <sub>2</sub>	5.0 ml
pure (Triton-X 100)	10.0 ml
Sterile water	655.0 ml

#### 2. Lysis Buffer II

5.0 M NaCl	15.0 ml
0.5 M EDTA	48.0 ml
Sterile water	937.0 ml

#### 3. TE buffer

1.0 M Tris-HCl	5.0 ml
0.5 M EDTA	1.0 ml
Sterile water	494.0 ml

#### 4. 10X Tris Boric and Disodium EthyleneDiamine Tetracetic Acid (1X TBE buffer)

Tris-base	108.0 g
Boric acid	55.0 g
0.5 M EDTA (pH8.0)	40.0 ml

เติมน้ำกลั่นจนได้ 1,000 ml. แล้วผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 5. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Disodium ethylenediamine tetraacetate.2H <sub>2</sub> O	93.06 g
sterile water	500.0 ml

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 โดยใช้ NaOH

เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 6. 2% Agarose gel (w/v)

Agarose	0.8 g
1X TBE	40.0 ml

ละลายให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนจาก hot plate แล้วเทใส่ใน gel tray และใช้ comb เสียบลงในเจล เมื่อเจลแข็งตัว นำเอา comb ออก แล้วจึงนำไปใช้

## 7. 40% Acrylamide gel 29:1 (SSCP)

Acrylamide	38.65 g
Bis acrylamide	1.35 g
Sterile water	100.0 ml

## 8. 8% Polyacrylamide gel

10X TBE	1.0 ml
40% acrylamide gel	2.0 ml
Sterile water	7.0 ml
TEMED	10.0 $\mu$ l
APS	100.0 $\mu$ l

## 9. 15% Polyacrylamide gel + 5% glycerol (SSCP gel)

10X TBE	1.0 ml
40% acrylamide gel 29:1 (SSCP)	3.75 ml
sterile water	5.25 ml
glycerol	0.6 ml
TEMED	10.0 $\mu$ l
APS	100.0 $\mu$ l

## 10. 10% APS

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	1.0 g
sterile water	10.0 ml

## 11. 6X loading dye

Bromphenol blue	0.25 g
Xylene cyanol	0.25 g
Glycerol	50.0 ml
1M Tris (pH8.0)	1.0 ml

เติมน้ำจนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

## 12. 0.1% SDS in 10 mM EDTA

0.5M EDTA pH 8.0	20.0 µl
10% SDS	10.0 µl
sterile water	970.0 µl

## 13. Ethidium bromide (Staining gel)

Ethidium bromide	10 mg
sterile water	1 ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

## 14. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)

Phenol	25 volume
Chloroform	24 volume
Isoamyl alcohol	1 volume

## 15. Cyber green (Staining SSCP gel)

1X TBE	30 ml
Cyber green	1.5 µl

## ภาคผนวก ข

### ขั้นตอนการ purify PCR products

ขั้นตอนการ purify โดย PCR purification kit (QIAgen) มีดังนี้

1. เติม Buffer PB ปริมาตร 5 เท่า ของปริมาตร PCR sample แล้ว mix ให้เข้ากันอย่างดี
2. ใส่ column ลงใน 2 ml collection tube
3. คูด sample ใส่นใน QIAquick column แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วสูงสุด เพื่อให้ DNA จับกับ membrane
4. เทสารละลายที่ผ่านลงมาทิ้งไป แล้วใส่ column กลับลงใน collection tube
5. เติม Buffer PE ปริมาตร 0.75 ml แล้วปั่นเป็นเวลา 1. นาที ที่ความเร็วสูงสุด เพื่อล้าง DNA ให้สะอาด
6. เทสารละลายที่ผ่านลงมาทิ้งไป แล้วปั่นต่ออีก 1 นาที ที่ความเร็วสูงสุด
7. ใส่ column ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube ที่สะอาด
8. เติม Buffer EB ปริมาตร 30  $\mu$ l ลงตรงกลางของ membrane ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วสูงสุด เพื่อ elute DNA

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายเทพฤทธิ์ สงวนไวกานิชกุล เพศ ชาย  
 อายุ 23 ปี เกิด 16 กรกฎาคม 2525  
 สถานที่เกิด โรงพยาบาลศูนย์ จังหวัดราชบุรี  
 ที่อยู่ 124/168 ถ.มนตรีสุริยวงศ์ ซอย 3 ต.หน้าเมือง อ.เมือง จ.ราชบุรี 70000  
 โทรศัพท์ 0-3233-7652

### ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)  
 จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2546  
 ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร  
 การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.  
 2547

### ประวัติการทำงาน

ปีการศึกษา 2545 นิสิตฝึกงานที่ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล  
 ปีการศึกษา 2546 ได้รับการคัดเลือกเป็นนิสิตดีเด่น ประจำปีการศึกษา 2546 ของ  
 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

-

### การนำเสนอผลงาน

- นำเสนอผลงานในหัวข้อเรื่อง การตรวจหาไมวเทชันของ *MECP2* gene  
 ในผู้ป่วยชายไทย (Detection of *MECP2* Mutation in Thai Male Patients)  
 ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 12 ประจำปี 2547 วันที่ 18-19 มีนาคม 2547  
 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย