

การศึกษาความชุกและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วย

ภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน

นายอรรคพล พิณีจินดาทรัพย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Prevalence and Factors Related to *NOTCH3* Mutations among Thai Patients with  
Acute Ischemic Stroke

Mr. Akkaphol Pinichjindasup



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความชุกและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน <i>NOTCH3</i> ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน
โดย	นายอรรคพล พิณจินดาทรัพย์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นิจศรี ชาญณรงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ แพทย์หญิง อรุมา ชูติเนตร

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกียรติ รัชชณรงค์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นิจศรี ชาญณรงค์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ แพทย์หญิง อรุมา ชูติเนตร)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ นายแพทย์ สืบพงศ์ ธารสารวิมล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชีรธร พูลเกษ)

อรรคพล พินิจจินดาทรัพย์ : การศึกษาความชุกและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ ยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน (Prevalence and Factors Related to *NOTCH3* Mutations among Thai Patients with Acute Ischemic Stroke) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. พญ. นิจศรี ชาญณรงค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. พญ. อรุมา ชุตินทร, หน้า.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความชุก ลักษณะอาการ ผลการตรวจภาพถ่ายของสมองและหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของผู้ที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือด

วิธีการวิจัย การวิจัยเชิงวิเคราะห์ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน ที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2558ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 จำนวนทั้งหมด 196 ราย อายุ 20-90 ปี, แล้วได้รับการตรวจเพื่อหากลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3*

ผลการศึกษา พบความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ประมาณร้อยละ 3.06 และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ทั้งในด้านปัจจัยเสี่ยงและลักษณะหลอดเลือดตีบที่ตรวจพบ ลักษณะของการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ใน exon 11 แบบ Arg544Cys พบร่วมกับพยาธิสภาพหลอดเลือดสมองขนาดเล็กและใน exon 4 พบแบบ His170Arg และ Ala564Thr ร่วมกับพยาธิสภาพหลอดเลือดใหญ่ตีบ

สรุป การศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ประมาณร้อยละ 3.06 และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ทั้งในด้านปัจจัยเสี่ยงและลักษณะหลอดเลือดตีบที่ตรวจพบ

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5774113530 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: CADASIL / ISCHEMIC STROKE / NOTCH3

AKKAPHOL PINICHJINDASUP: Prevalence and Factors Related to *NOTCH3* Mutations among Thai Patients with Acute Ischemic Stroke. ADVISOR: PROF. NIJASRI CHARNNARONG, M.D., CO-ADVISOR: AURAUMA CHUTINET, M.D., pp.

Objective: Cerebrovascular disease is the leading cause of death in Thai population. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) is a genetic *NOTCH3*-mutant small vessel disease which causes stroke in adults. This study is to evaluate the prevalence and factors related to *NOTCH3* mutation in Thai patients with acute ischemic stroke.

Method: Thai patients with acute ischemic stroke from King Chulalongkorn Memorial Hospital between July 2015 and February 2016 were recruited. Patients over 20 years of age were tested for *NOTCH3* mutation for exon 3, 4 and 11. The primary outcome was prevalence of *NOTCH3* mutation in Thai patients with acute ischemic stroke. Secondary outcomes were clinical and brain imaging characteristics, variations of *NOTCH3* mutation and intracerebral vascular stenosis in mutant and normal *NOTCH3* groups.

Results: The prevalence of *NOTCH3* mutation was 6 out of 196 cases (3.06%). There were no statistically significance between groups in age ( $p=0.21$ ), diabetes ( $p=1.00$ ), hypertension ( $p=1.00$ ), hyperlipidemia ( $p=1.00$ ), history of previous stroke ( $p=1.00$ ) and smoking ( $p=0.60$ ). The mutant cases with small vessel disease were the known mutation in exon 11 (Arg544Cys). While in exon 4, known mutation (His170Arg) and novel mutation (Ala564Thr) were found with large vessel atherosclerosis.

Conclusion: The prevalence of *NOTCH3* mutation was 3.06%. There were no statistically significance between groups in clinical features, risk factors and brain imaging.

Department: Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2015

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากความเมตตากรุณา และความช่วยเหลือเป็นอย่างสูงจาก ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนิจศรี ชาญณรงค์อาจารย์ และ อาจารย์ แพทย์หญิงอรอุมา ชุตินทร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีเสมอมา ซึ่งผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่หน่วยงานตลอดเลืดสมอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างเลือดและขอบพระคุณผู้ป่วยและผู้ดูแลทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการครั้งนี้

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญภาพ.....	1
บทที่ 1.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามการวิจัย .....	1
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมุติฐานของการวิจัย.....	2
1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	2
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย .....	3
1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย.....	3
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข .....	8
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง .....	9
หลักการขั้นตอนการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน.....	13
Polymerase chain reaction (PCR).....	14
บทที่ 3.....	18
3.1 รูปแบบการวิจัย .....	18
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....	18

3.2.1 ประชากรและตัวอย่าง.....	18
3.3 ขนาดตัวอย่าง .....	19
3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล .....	19
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	23
3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย.....	23
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	24
4.1. ประชากรที่นำมาศึกษา.....	24
4.2. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย .....	24
4.3. ผลการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>NOTCH 3</i> .....	27
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ.....	36
5.1 อภิปรายผล .....	36
5.2 สรุปผลการศึกษา .....	40
5.3 ข้อดีของการศึกษา .....	40
5.4 ข้อด้อยของการศึกษา .....	41
5.5 ข้อเสนอแนะ .....	41
เอกสารอ้างอิง .....	42
.....	44
รายการอ้างอิง .....	44
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	45



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดง forward primer และ reverse primer ที่ใช้ใน exon 3, 4 และ 11 .....	21
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย.....	25
ตารางที่ 3 แสดงเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>NOTCH3</i> .....	26
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลของผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน <i>NOTCH3</i> .....	28
ตารางที่ 5 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน <i>NOTCH3</i> ที่ตรวจพบในผู้ป่วยแต่ละราย .....	29
ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเบสบางตำแหน่งบนยีน <i>NOTCH3</i> ที่พบใน ผู้ป่วยชาวไทย .....	30

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงกรอบความคิดแนววิจัย .....	3
ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบยีนและกรดอะมิโนของ <i>NOTCH3</i> receptor.....	10
ภาพที่ 3 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบส และจำนวนกรดอะมิโน cysteine บน Exon 11 ของยีน <i>NOTCH3</i> ในผู้ป่วย .....	31
ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนของชนิดกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ cysteine บน Exon 4 ของยีน <i>NOTCH3</i> ในผู้ป่วย.....	32
ภาพที่ 5 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบสที่ไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบน Exon 4 ของ ยีน <i>NOTCH3</i> .....	32
ภาพที่ 6 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบสที่ไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบน Exon 3 ของ ยีน <i>NOTCH3</i> .....	33
ภาพที่ 7 แสดงการเปลี่ยนของชนิดกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ cysteine บน Exon 11 ของยีน <i>NOTCH3</i> ในผู้ป่วย.....	33
ภาพที่ 8 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบสที่ไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบน Exon 11 ของ ยีน <i>NOTCH3</i> .....	34
ภาพที่ 9 แสดงการเรียงตัวของกรดอะมิโนอย่างคงที่ของ <i>NOTCH3</i> ที่ตำแหน่ง 170 ใน สิ่งมีชีวิตหลายชนิด .....	35
ภาพที่ 10 แสดงการเรียงตัวของกรดอะมิโนอย่างคงที่ของ <i>NOTCH3</i> ที่ตำแหน่ง 564 ใน สิ่งมีชีวิตหลายชนิด .....	35

## บทที่ 1

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรไทย และจำนวนผู้ป่วยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมาเป็นลำดับ โรคหลอดเลือดสมองมักเกิดจากภาวะสมองขาดเลือด ซึ่งมีสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากหลอดเลือดสมองขนาดเล็กอุดตัน ทั้งนี้ ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาด้านระบาดวิทยาเกี่ยวกับภาวะสมองขาดเลือดที่เกิดจากพยาธิสภาพของหลอดเลือดขนาดเล็กจากโรคทางพันธุกรรม ที่ชื่อว่า Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดในผู้ใหญ่ ร่วมกับการเกิดภาวะสมองเสื่อมตามมา โดยสามารถวินิจฉัยโรคนี้ด้วยการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* จากข้อมูลการศึกษาในหลายประเทศ พบว่า ลักษณะของโรค CADASIL มีความแตกต่างกันบางส่วนในด้านอาการที่เกี่ยวข้องกับโรค ทั้งนี้ ในประเทศไทยเคยมีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคนี้ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* บริเวณ exon 3 ดังนั้น การศึกษาเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการทราบความชุกของโรค ตลอดจนลักษณะอาการ ผลการตรวจทางภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ของผู้ป่วยในประเทศไทย เพื่อนำไปสู่การวางแผนเพื่อดูแลผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้ดียิ่งขึ้นต่อไปได้

### 1.2 คำถามการวิจัย

คำถามวิจัยหลัก: ความชุกของผู้ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน เป็นเท่าไร

What is the prevalence of *NOTCH3* mutations among Thai patients with acute ischemic stroke?

คำถามรอง: ลักษณะอาการ รวมทั้งผลการตรวจภาพถ่ายของสมองและหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของผู้ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือด

เฉียบพลัน แตกต่างจากผู้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน หรือไม่

Is there some difference of clinical manifestation and brain imaging between *NOTCH* mutations and normal *NOTCH3* among Thai patients with acute ischemic stroke?

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความชุก ลักษณะอาการ ผลการตรวจภาพถ่ายของสมองและหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของผู้ที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือด

เพื่อศึกษาลักษณะของหลอดเลือดสมองที่ตีบของผู้ที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือด

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

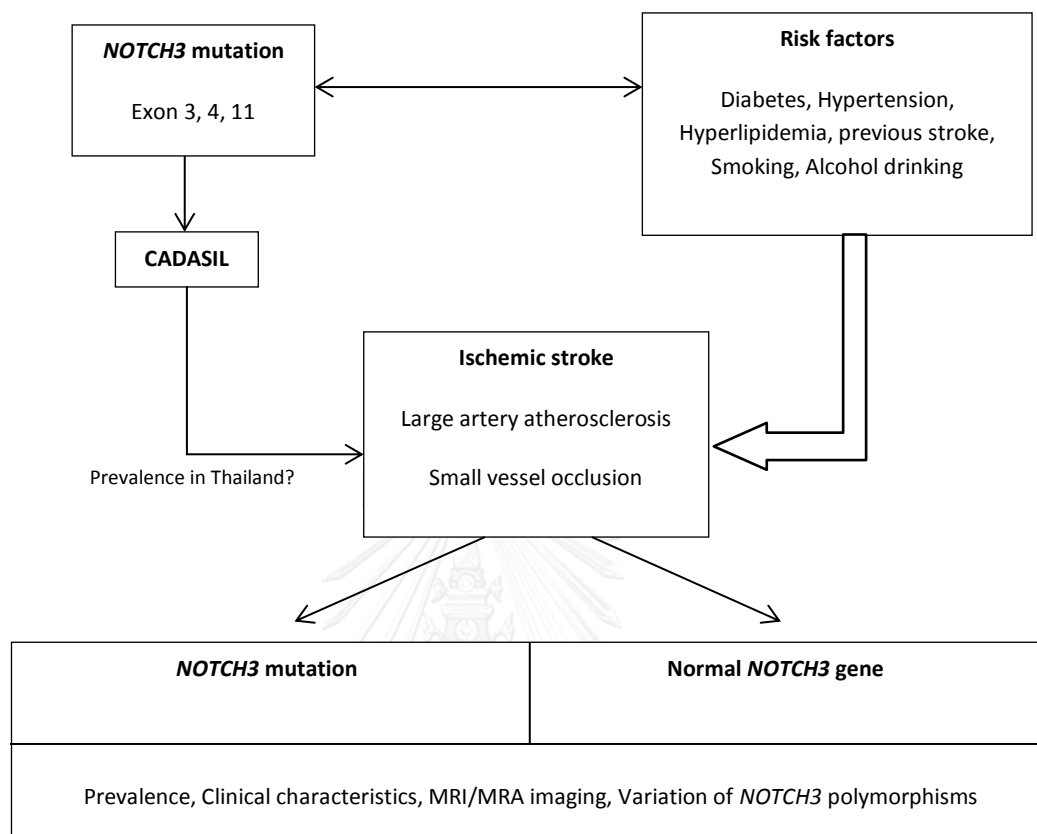
### 1.4 สมมุติฐานของการวิจัย

ความชุกของผู้ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในผู้ป่วยสัญชาติไทยที่มีภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน แตกต่างจากความชุกของผู้ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* จากการศึกษาอื่นที่ผ่านมา ในผู้ป่วยต่างชาติที่มีภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน

### 1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น: ไม่มี

## 1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

ภาพที่ 1 แสดงกรอบความคิดแนววิจัย



## 1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

### 1.7.1 ภาวะสมองขาดเลือด (ischemic stroke)

ภาวะที่ผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงทางระบบประสาทผิดปกติ ซึ่งเป็นอยู่นานเกิน 24 ชั่วโมง โดยสามารถอธิบายจากขอบเขตของหลอดเลือดสมองได้ด้วยการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

### 1.7.2 Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)

โรคทางพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดภาวะสมองขาดเลือดและมีสมองตายร่วมด้วย จากการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดยตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ที่บริเวณ exon 3, 4 และ 11(2)

#### 1.7.3 Transient ischemic attack (TIA)

ภาวะที่ผู้ป่วยมีสมองขาดเลือด ทำให้มีอาการและอาการแสดงทางระบบประสาทผิดปกติ ซึ่งหายภายใน 24 ชั่วโมง

#### 1.7.4 โรคเบาหวาน

- ตรวจ FPG  $\geq 126$  mg/dl(3)หรือ
- random plasma glucose  $\geq 200$  mg/dl ร่วมกับอาการที่เข้าได้กับโรคเบาหวาน(3) หรือ
- มีประวัติการโรคเบาหวาน หรือ กำลังได้รับยารักษาโรคเบาหวานอยู่

#### 1.7.5 โรคความดันโลหิตสูง

- วัดความดันโลหิตได้มากกว่า 140/90 mmHg ขณะพัก โดยทำการวัดอย่างถูกต้อง 2 ครั้ง (4) หรือ
- มีประวัติเคยวัดความดันโลหิตได้มากกว่า 140/90 mmHg หรือ
- มีประวัติการโรคความดันโลหิตสูง หรือ กำลังได้รับยารักษาโรคความดันโลหิตสูงอยู่

#### 1.7.6 โรคไขมันในเลือดสูง

- ตรวจพบระดับ cholesterol  $> 200$  mg/dl หรือ LDL  $> 100$  mg/dl หรือ HDL  $< 40$  mg/dl(5)หรือ
- มีประวัติการโรคไขมันในเลือดสูง หรือ กำลังได้รับยารักษาโรคไขมันในเลือดสูงอยู่

#### 1.7.7 การสูบบุหรี่

- ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่: ไม่เคยสูบ หรือ เลิกสูบบุหรี่มานานเกิน 5 ปี

- ผู้ที่สูบบุหรี่: สูบมากกว่า 1 มวนต่อวัน หรือ เลิกสูบนานน้อยกว่า 5 ปี

#### 1.7.8 การดื่มสุรา

- ผู้ที่ไม่ดื่มสุรา : ไม่เคยดื่มสุรา หรือ เลิกดื่มมานานเกิน 6 เดือน
- ผู้ที่ดื่มสุรา : ผู้ที่กำลังดื่ม หรือ เลิกดื่มมาน้อยกว่า 6 เดือน

#### 1.7.9 ดัชนีมวลกาย (body mass index)

- ภาวะน้ำหนักเกิน (overweight) : ดัชนีมวลกายมากกว่า 25-29.9 กิโลกรัม/เมตร<sup>2</sup>
- โรคอ้วน (obesity) : ดัชนีมวลกายมากกว่า 30 กิโลกรัม/เมตร<sup>2</sup> (6)

#### 1.7.10 อาการปวดศีรษะแบบไมเกรน (Migraine headache)

- with aura : ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะที่เข้าได้กับโรคไมเกรน ร่วมกับมีอาการนำมาก่อน ซึ่งเป็นอาการผิดปกติทางระบบประสาทเฉพาะที่และหายเอง(7)
- without aura : ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะที่เข้าได้กับโรคไมเกรน แต่ไม่มีอาการผิดปกติทางระบบประสาทนำมาก่อน(7)

#### 1.7.11 ภาวะความจำเสื่อม (Cognitive decline)

- ผู้ป่วยได้รับการประเมินด้วย The Montreal Cognitive Assessment (MoCA) อย่างถูกต้อง แล้วมีค่าน้อยกว่า 26(8)หรือ
- ผู้ป่วยได้รับการประเมินด้วย The Mini-Mental State Examination (MMSE) อย่างถูกต้อง แล้วมีค่าน้อยกว่า 24(9)

#### 1.7.12 ภาวะความผิดปกติทางจิต (Psychiatric disturbances)

- depression: ผู้ป่วยมีภาวะซึมเศร้า ซึ่งได้รับการประเมินโดยจิตแพทย์ หรือ
- apathy: ผู้ป่วยมีอาการเฉยเมย ไม่แสดงความรู้สึกใดๆ ซึ่งได้รับการประเมินโดยจิตแพทย์

### 1.7.13 Leukoencephalopathy

- extended to temporal pole : ความผิดปกติของสมองในส่วน white matter จากการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ที่ขยายขอบเขตเข้าไปในบริเวณ temporal pole หรือ

- extended to external capsule : ความผิดปกติของสมองในส่วน white matter จากการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ที่ขยายขอบเขตเข้าไปในบริเวณ external capsule

### 1.7.14 Subcortical infarct

มีลักษณะสมองตายในส่วน white matter ของ cerebral hemispheres จากการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

### 1.7.15 Microbleed

มีลักษณะจุดเลือดออกขนาดเล็กมากภายในสมอง จากการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

### 1.7.16 หลอดเลือดสมองและคาโรติดที่เกี่ยวข้อง (cerebrovascular and carotid artery stenosis)

- ACA stenosis : หลอดเลือดสมองส่วนหน้าตีบจากการตรวจภาพถ่ายของหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

- MCA stenosis : หลอดเลือดสมองส่วนกลางตีบจากการตรวจภาพถ่ายของหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

- PCA stenosis : หลอดเลือดสมองส่วนหลังตีบเกินจากการตรวจภาพถ่ายของหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

- ICA stenosis : หลอดเลือดคาโรติกส่วนในตีบเกินจากการตรวจภาพถ่ายของหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า



- VA stenosis : หลอดเลือด vertebral artery ตีบเกินจากการตรวจภาพถ่ายของหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

#### 1.7.17 สาเหตุของภาวะสมองขาดเลือดที่แบ่งตาม TOAST classification

- Large-artery atherosclerosis: ภาวะสมองขาดเลือดจากการตีบของหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่
- Small-vessel occlusion (lacunar): ภาวะสมองขาดเลือดจากการตีบของหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก
- Cardioembolism: ภาวะสมองขาดเลือดจากการมีลิ่มเลือดมาอุดตันหลอดเลือด
- Stroke of other determined etiology: ภาวะสมองขาดเลือดจากสาเหตุอื่น ๆ นอกจากที่กล่าวมา
- Stroke of undetermined etiology: ภาวะสมองขาดเลือดที่ไม่ทราบสาเหตุ

#### 1.7.18 การกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* (*NOTCH3* gene mutation)

- mutation in Exon : มีการกลายพันธุ์ในส่วน exon ของยีน
- mutation in non-coding regions : มีการกลายพันธุ์นอกส่วน exon ของยีน
- normal : ไม่มีมีการกลายพันธุ์ของยีน

### 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.8.1 ในอนาคตอาจนำข้อมูลที่ได้ มาพัฒนาเพื่อใช้วางแผนในการดูแลรักษาภาวะสมองขาดเลือดจากโรคนี้ได้

1.8.2 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับ *NOTCH3* ในคนไทยซึ่งสามารถนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของการศึกษาในต่างเชื้อชาติ และพัฒนาการตรวจวิเคราะห์

*NOTCH3* ให้เหมาะสมและได้ประโยชน์คุ้มค่างับค่าใช้จ่ายในการตรวจในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองชาวไทย

1.8.3 สามารถนำข้อมูลที่ได้มาทำการศึกษาในด้านอื่นๆ ต่อไปได้ หากมีข้อมูลเพิ่มเติมในอนาคต

## 1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

1.9.1 มีข้อจำกัดในการนำส่งตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจทางพันธุกรรมนอกสถานที่ (รพ. รามาธิบดี)

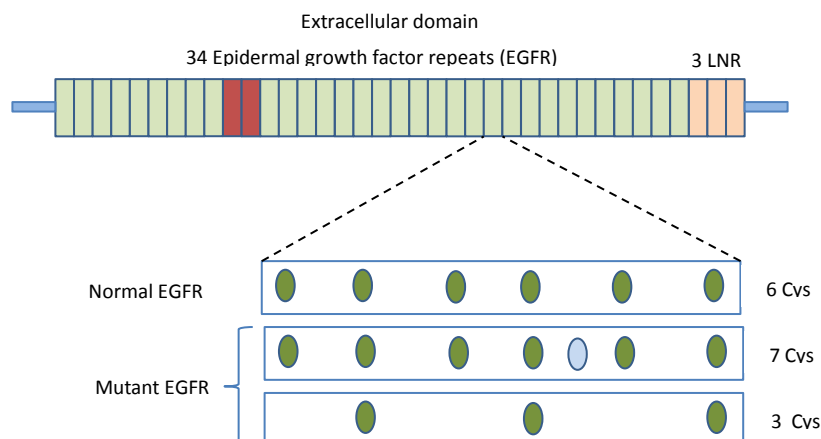


## บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) เป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่ถ่ายทอดแบบทายกรรมลักษณะเด่น (autosomal dominant) จากความผิดปกติของยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 19 โดย Tournier-Lasserre และคณะรายงานตั้งแต่พ.ศ. 2536 ต่อมา มีการค้นพบว่า โรค CADASIL เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* บนโครโมโซมคู่ที่ 19 โดยจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดหรือลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ *NOTCH3* receptor บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือดแดงทั่วร่างกายโดยเฉพาะหลอดเลือดแดงขนาดเล็กในเนื้อสมองและเยื่อหุ้มสมอง ซึ่งทำให้เกิดตายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือดแดงและพบสะสมของ granular osmiophilic material ในบริเวณดังกล่าว ร่วมกับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงทำให้เกิดการตีบของหลอดเลือดแดงตามมา ทั้งนี้ พยาธิสภาพของสมองใน CADASIL จะพบการตายของเนื้อสมองเป็นหย่อมขนาดเล็กที่บริเวณ subcortical white matter และ basal ganglia(2, 10)

โดยปกติ ยีน *NOTCH3* อยู่บนโครโมโซมที่ 19 ในตำแหน่งที่ 13.1 ถึง 13.2 โดยมีส่วนประกอบของยีนอยู่ 33 exons ที่จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนขนาดความยาวของกรดอะมิโน 2,321 ตัว มาเป็น *NOTCH3* receptor บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือดแดง โรค CADASIL นั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเฉพาะในบริเวณตำแหน่ง exon 2 ถึง 24 เท่านั้น โดยตำแหน่งเหล่านี้จะถูกถอดรหัสเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ *NOTCH3* receptor ที่อยู่บริเวณภายนอกเซลล์ (extracellular) หรือเรียกอีกชื่อว่า N-terminal extracellular domain (N3ECD)

โครงสร้าง N3ECD นี้มีองค์ประกอบย่อยๆ รวมกันจาก 34 epidermal growth factor repeats (EGFRs) และ 3 Notch/Lin12 repeats (LNR) โดยในแต่ละ EGFR จะมีองค์ประกอบเป็นกลุ่มสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิด cysteine (Cys) อยู่ 6 ตำแหน่ง ดังรูปภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบยีนและกรดอะมิโนของ *NOTCH3* receptor

การกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในบริเวณ exon ดังกล่าวข้างต้น ทำให้จำนวนกรดอะมิโนชนิด cysteine ในบาง EGFRs นั้นมีจำนวนเปลี่ยนไปจากเดิม ส่งผลให้โครงสร้างและการทำงานของ *NOTCH3* receptor ผิดปกติ และเมื่อ *NOTCH3* receptor ถูกกระตุ้น จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน nucleus ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในบริเวณผนังหลอดเลือด โดยเฉพาะบริเวณหลอดเลือดในสมอง ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงหน้าที่การทำงานของ *NOTCH3* receptor ของมนุษย์ ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้มีการเสื่อมสลายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบนั้น ร่วมกับผนังหลอดเลือดที่หนาตัวขึ้นและพบการสะสมของ GOM (2, 10, 11)

การตรวจวินิจฉัยโรค CADASIL ต้องอาศัยการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ใน exon รวมทั้งหมด 23 exons ตั้งแต่ exon 2 ถึง 24 โดยมีความจำเพาะสูงถึง 100% (2) จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมา ส่วนใหญ่ในทวีปยุโรป การกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* พบมากในบริเวณตำแหน่งของ exon 3, 4 และ 11 โดยการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยเกิดจาก missense mutation แต่มีบางรายงานที่พบ small intragenic deletions, duplication, splice site mutation และ deletion/insertion ได้ ซึ่งต่างทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนกรดอะมิโน cysteine ใน EGFRs ได้ (10, 12) สำหรับในประเทศไทย เคยมีรายงานผู้ป่วยที่เป็นโรค CADASIL 1 คนในปี พ.ศ. 2546 โดยตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ที่บริเวณ exon 3(13)

CADASIL เป็นโรคที่มีความชุกโดยประมาณ 4-15 คนต่อประชากรในทวีปยุโรป 100,000 คน และพบในผู้ป่วยวัยผู้ใหญ่ ลักษณะทางคลินิกเฉพาะของโรคประกอบด้วย 1) ภาวะสมองตายเป็นหย่อมขนาดเล็ก (lacunar infarcts) และภาวะสมองขาดเลือดที่หายเป็นปกติภายใน 24 ชั่วโมง (Transient ischemic attack) เป็นภาวะที่พบบ่อยที่สุดของผู้ป่วย CADASIL ประมาณ 60-85% ของผู้ป่วย โดยส่วนใหญ่เริ่มเป็นตอนอายุประมาณ 30-40 ปีและเกิดขึ้นซ้ำๆหลายครั้ง 2) ภาวะสมองเสื่อม เป็นภาวะที่พบได้รองลงมา โดยมักเริ่มจากความสามารถในการตัดสินใจและความเร็วในการคิดลดลง 3) ภาวะอารมณ์แปรปรวนและอาการทางจิตเวช พบได้ประมาณ 20% ส่วนใหญ่มีภาวะซึมเศร้า 4) ปวดศีรษะแบบไมเกรน โดยมักจะมีอาการนำ (aura) นำมาก่อน พบได้ประมาณ 20-40% โดยเริ่มเป็นตอนช่วงอายุประมาณ 20-30 ปีและเป็นอาการแรกๆของโรค 5) ผลการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า มักพบความผิดปกติที่มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณ T2-weighted imaging หรือ fluid-attenuated inversion recovery ทั่วๆเนื้อสมองทั้ง 2 ข้าง โดยมักพบจำเพาะที่บริเวณ external capsule และ anterior part of temporal lobes นอกจากนี้ ยังพบการตายของเนื้อสมองเป็นหย่อมขนาดเล็กและสามารถพบจุดเลือดออกขนาดเล็กร่วมด้วย(2, 10, 14)

การตรวจวินิจฉัย CADASIL อาศัยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ทั้งนี้ *NOTCH3* ประกอบด้วย 33 exon ที่จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนขนาดความยาวของกรดอะมิโน 2,321 ตัว เพื่อประกอบกันเป็น *NOTCH3* receptor บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดง ในปัจจุบันพบว่า CADASIL เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเฉพาะในบริเวณตำแหน่ง exon 2 ถึง 24 ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้จะถูกถอดรหัสเป็นส่วนประกอบของ *NOTCH3* receptor ที่อยู่บริเวณภายนอกเซลล์ ประกอบโครงสร้างเป็น 34 domains รวมเรียกว่า epidermal growth factor repeats (EGFRs) โดยแต่ละ domain จะมีองค์ประกอบย่อยเป็นกลุ่มสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิด cysteine อยู่ 6 ตำแหน่ง(2)

ผู้ป่วย CADASIL ส่วนใหญ่ในทวีปยุโรป การกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* พบมากในบริเวณตำแหน่งของ exon 3, 4, 11(12) เนื่องจากการวินิจฉัย CADASIL จำเป็นต้องอาศัยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ดังนั้น Pescini และคณะตีพิมพ์การศึกษาในปี พ.ศ.2555 ซึ่งได้รวบรวมการรายงานของผู้ป่วย CADASIL มาศึกษาในรูปแบบลักษณะอาการ ผลการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า แล้ววิเคราะห์จัดทำเป็น CADASIL scale เพื่อใช้คัดกรองผู้ป่วยสำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* โดยค่าที่มากกว่า 15 จะมีความไวและความจำเพาะต่อโรค

96.7% และ 74.2% ตามลำดับ โดยมักมีผู้ป่วยที่เป็นโรคทางหลอดเลือดสมองขนาดเล็กแบบอื่นๆ ปะปนอยู่(15) จึงยังไม่มีลักษณะอาการหรือผลการตรวจภาพถ่ายของสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่สามารถใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคนี้ได้

ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ CADASIL ในทวีปเอเชียมีรายงานในหลายประเทศ เช่น Kim และคณะทำการศึกษาผู้ป่วย CADASIL ชาวเกาหลีจำนวน 27 คนในพ.ศ. 2548 โดยพบว่า มีการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในตำแหน่ง exon ที่ 3, 4 และ 11 ลักษณะอาการของผู้ป่วยมาด้วยภาวะสมองขาดเลือดส่วนใหญ่และพบผู้ป่วยเพียง 1 คนที่มีอาการปวดศีรษะแบบไมเกรนที่มี aura(16) ในพ.ศ. 2553 Wang และคณะ พบว่า ผู้ป่วย CADASIL ชาวจีนจำนวน 48 คน มีการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ใน exon 4 (55%) และ 3 (30%) ลักษณะอาการของผู้ป่วยมาด้วยภาวะสมองขาดเลือด 82% ภาวะความจำเสื่อม 60% และพบภาวะปวดศีรษะแบบไมเกรนที่มี aura เพียง 5% ของผู้ป่วยที่มีอาการ(17)

ในปีพ.ศ. 2556 Choiและคณะทำการศึกษาดูหาการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ในกลุ่มผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดทุกคนจำนวน 151 คนที่ประเทศเกาหลี พบว่า มีผู้ป่วยที่เป็น CADASIL 6 คน (4%; 95%CI 0.9 – 7.1) โดยลักษณะการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* พบในตำแหน่ง exon 11 ทั้งหมด ทั้งนี้ มีผู้ป่วย CADASIL 4 ใน 6 คนมาด้วยภาวะสมองขาดเลือดจากหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่(18) เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Choiและคณะ เกี่ยวกับการพบว่า ผู้ป่วย CADASIL มีหลอดเลือดแดงใหญ่ในสมองตีบร่วมด้วย นอกจากการพบสมองตายเป็นหย่อมขนาดเล็กหลายบริเวณ และลักษณะผิดปกติของสมองส่วน white matter(19) ในปีพ.ศ. 2557 Ince และคณะทำการศึกษาผู้ป่วย CADASILชาวตุรกี 25 คน พบว่า อายุที่เริ่มมีอาการสมองขาดเลือดนั้นประมาณ 38.8 ปี และมีอาการปวดศีรษะไมเกรนที่มี aura ประมาณ 38% โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีประวัติของคนในครอบครัวที่มีภาวะสมองขาดเลือด(20) สำหรับในประเทศไทย เคยมีรายงานผู้ป่วยที่เป็นโรค CADASIL 1 คนในปีพ.ศ. 2546 ผู้ป่วยมีอาการผิดปกติทางจิต ร่วมกับประวัติของคนในครอบครัวที่มีภาวะสมองขาดเลือดและสมองเสื่อม โดยผู้ป่วยไม่มีอาการปวดศีรษะไมเกรนและตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* ที่บริเวณ exon 3(21)

## หลักการขั้นตอนการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน

การตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆได้ตามลำดับ ดังนี้

### 1. การแยกสารพันธุกรรมจากเลือด (DNA Extraction)

เป็นการใช้ตัวทำละลายหลายชนิด เพื่อสกัด DNA ออกมาจากเม็ดเลือดขาว โดยขั้นตอนต่างๆ มีดังต่อไปนี้

- ปั่นเลือดที่บรรจุหลอดด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- นำสาร supernatant (plasma) ที่ได้จากการปั่นแยกออกมาอย่างระมัดระวัง
- นำชั้นสาร buffy coat ใส่หลอดขนาด 15 ซีซี และผสมสาร Lysis buffer แล้วผสมด้วยการเอียงไปมา นาน 10 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกจนหมด
- นำมาทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที จะพบว่ามีสารที่ขาวที่ก้นหลอด ให้เอียงหลอดน้ำออกไปอย่างระมัดระวัง แล้วใส่สาร lysis buffer อีกครั้งเพื่อทำขั้นตอนที่ 3 และ 4 อีกครั้ง
- นำน้ำบริสุทธิ์ปริมาณ 1 ซีซี ผสมกับ 50  $\mu$ l WBC lysing solution จนได้ปริมาณ 15 ซีซี แล้วเขย่า ตามด้วยผสม 25  $\mu$ l 10% SDS และ 25  $\mu$ l 10 mg/ml proteinase K. แล้วจึงผสมด้วย vortex
- นำมาอบค้ำคืนในอุณหภูมิ 56°C ความหนืดของสารลดลง เนื่องจากได้ lysis cell ไปแล้ว
- ผสมด้วยอัตราส่วนเท่าๆกันกับ phenol (ผสมกับ 0.1 M TrisHCl). 1.5 ซีซี แล้วนำไปผสมต่อโดยการเอียงหลอดไปมา นาน 10 นาที แล้วจึงนำมาทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที
- นำชั้นสารน้ำที่อยู่ด้านบนมา 1.5 ซีซี แล้วผสมกับ chloroform นำไปผสมต่อโดยการเอียงหลอดไปมา นาน 10 นาที แล้วจึงนำมาทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที

- นำชั้นสารน้ำที่อยู่ด้านบนมา 1.5 ซีซี แล้วผสมกับ 1/10 ของ 3 M Sodium acetate ผสมโดยใช้ pipetting แล้วจึงใส่ 100% ethanol นำไปผสมต่อโดยการเอียงหลอดไปมาจน DNA ตกตะกอน
- แล้วจึงนำมาทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที เพื่อแยก DNA
- ค่อยๆเท 100% ethanolออก และผสม 1 ซีซีของ 70% ethanol เพื่อล้าง DNA แล้วจึงนำมาเขย่าและทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที
- ค่อยๆเท 100% ethanolออก แล้วทิ้ง DNA ให้ติดกันหลอดไว้ เป่าลมจนกระทั่ง ethanol ระเหยหมด
- ล้างต่อด้วยน้ำบริสุทธิ์ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้ DNA แยกออกมา

## 2. DNA amplifying

เป็นขั้นตอนการทำเพื่อเพิ่มจำนวนของสาย DNA ด้วยการทำ polymerase chain reaction (PCR) เป็นการใส่สาร primer หรือสายลำดับของเบส nucleotide ที่จำเพาะกับตำแหน่งบน DNA ที่ต้องการจะทำ PCR โดยแบ่งออกเป็น forward primer ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ DNA ไปจากตำแหน่ง 5'ไป 3' และ backward primer ซึ่งจะสังเคราะห์ DNA ในทิศทางตรงกันข้าม

### Polymerase chain reaction (PCR)

เป็นวิธีการทำสำเนาของ DNA โดยไม่ใช้ cell เป็นองค์ประกอบในกระบวนการ ซึ่งวิธีการนี้ ถูกคิดค้นขึ้นในประมาณปี พ.ศ.2523 PCR สามารถเพิ่มจำนวนในตำแหน่ง DNA ที่ต้องการได้อย่างจำเพาะ (target DNA) จาก DNA ต้นแบบที่มาจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ทั้งนี้ target DNA ที่ต้องการส่วนใหญ่มีจำนวนของคู่เบสไม่มากนัก อาจมีประมาณพันคู่เบส และไม่ควรมากเกิน 5,000คู่เบส ซึ่งจะเป็นเพียงบางส่วนของสาย DNA ทั้งหมด หากต้นแบบเป็นสาย RNA แล้วต้องการทำเป็นสาย DNA จำนวนมาก สามารถใช้วิธีการทำ reverse transcriptase PCR (RT-PCR) ได้ ซึ่งโดยทั่วไป สาย RNA สามารถถูกสร้างมาจาก DNA หลากหลายรูปแบบ ดังนั้น วิธีการ RT-PCR นี้ทำให้สามารถสร้างสำเนาของรูปแบบ target DNA ที่ต้องการในปริมาณมากได้(22)



วิธีการ PCR ขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์สารของนิวคลีโอไทด์เป็นสาย DNA สายใหม่ในตำแหน่งที่จำเพาะ โดยใช้กระบวนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ที่เรียกว่า thermocycling มีรายละเอียดประกอบด้วย

1. Denaturation เป็นขั้นตอนแรก โดยสาย DNA ต้นแบบของมนุษย์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนประมาณ 93-95 องศาเซลเซียส ทำให้ให้พันธะ hydrogen bond สลายไป แล้วส่งผลให้เกิดการคลายเกลียวของสายคู่ของ DNA ได้ เกิดเป็น DNA สายเดี่ยว (single-stranded DNA)

2. Annealing เป็นขั้นตอนถัดมา หลังจากทำให้ single-stranded DNA เย็นตัวลง ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ (primer) เข้าไปจับกับสาย DNA ในตำแหน่งลำดับเบสที่ต้องการ โดย primer ที่ดี ควรมีจำนวนเบสประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์, สามารถเกาะอย่างจำเพาะกับตำแหน่งของสาย DNA และไม่ควรมีลำดับของเบสที่สามารถจับคู่กันเองได้บนสาย primer อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้ จะมีค่าต่ำกว่า melting temperature ( $T_m$ ) ไปประมาณ 5 องศาเซลเซียส ซึ่ง  $T_m$  เป็นอุณหภูมิที่ได้จากการคำนวณ(22)

3. DNA synthesis ส่วนผสมที่ประกอบไปด้วยเบสนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP จะเข้าไปจับเข้ากับสาย DNA เดี่ยวต่อจากที่ primer ได้เกาะไว้ก่อนแล้ว สร้างต่อเนื่องเกิดเป็น DNA สายคู่ขึ้นได้ด้วย heat-stable DNA polymerase ซึ่งอาจมี 3'-5' exonuclease activity ด้วยก็ได้ ซึ่งช่วยในการตรวจสอบคู่เบสที่เข้ามาเกาะให้ได้อย่างถูกต้อง โดยใช้ อุณหภูมิในกระบวนการนี้ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส(22)

หลังจากนั้น จะเริ่มขั้นตอนใหม่อีกครั้ง ทั้งหมด 30-40 รอบ ตั้งแต่ denaturation, annealing และ DNA synthesis โดยสาย DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ (complementary DNA) สามารถเป็นสายตั้งต้นสำหรับการสร้างต่อไปได้ด้วย ทำให้ได้ปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว กระบวนการจะค่อยๆ ช้าลงจนสิ้นสุด เมื่อนิวคลีโอไทด์หมดลง หลังจากนั้น จึงนำ DNA ที่ได้มาทำการแยกตามขนาดน้ำหนักของโครงสร้างด้วย agarose gel electrophoresis ร่วมกับการใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสงภายใต้รังสีอุตราไวโอเล็ตได้ ใช้เพื่อช่วยหาบริเวณที่มี target DNA ที่ต้องการบนแผ่น gel แล้วจึงสามารถนำมาใช้ต่อไป(22)

สำหรับวิธีการที่เรียกว่า quantitative PCR (qPCR) หรือ real-time PCR มีกระบวนการพิเศษเพิ่มเติมขึ้น โดยจะมีการใช้เครื่องมือ fluorescence-detecting thermocycler machine เพื่อเพิ่มจำนวนชนิดของนิวคลีโอไทด์จำเพาะสำหรับการสร้างสาย DNA พร้อมกับวิเคราะห์ข้อมูลความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์นั้นด้วยในขณะที่กำลังเกิดปฏิกิริยา ทำให้ทราบได้ว่า กำลังสร้างสาย target DNA มีขนาดตรงกับที่ต้องการไว้ได้(22)

การทำ DNA amplifying มีขั้นตอนดังนี้

— Initial Denature	95°C	5	min	
— Denature	95°C	45	sec	} 11 รอบ
— Annealing	Decrease 1°C/cycle from 68-58°C	45	sec	
— Extension	72°C	30	sec	
— Denature	95°C	45	sec	} 22 รอบ
— Annealing	58°C	45	sec	
— Extension	72°C	30	sec	
— Final Extension	72°C	5	min	

### 3. DNA sequencing

เป็นวิธีการหาลำดับของชนิดนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA แรกเริ่มถูกคิดค้นโดย Fred Sanger ในช่วง 50 ปีที่ผ่านมา ซึ่งได้ใช้วิธี enzymatic sequencing method ด้วยหลักการที่ enzyme จะสามารถตัด DNA ในตำแหน่งที่จำเพาะ ที่ให้ได้ขนาดสาย DNA ที่มีความยาวแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ถูกตัด ต่อมาสาย DNA แต่ละสายจะถูกนำมาหาชนิดของนิวคลีโอไทด์โดยใช้ 4 dNTPs (dATP, dGTP, dCTP dTTP) ร่วมกับ 1 analogous dideoxynucleotide (ddNTPs) โดย ddNTPs จะเป็น chain terminator ที่ตำแหน่งเบสที่ตรงกับชนิดของ ddNTP ทำให้ทราบตำแหน่งการเรียงตัวของเบสในแต่ละสายของ DNA ได้ นอกจากนี้ ได้มีการพัฒนาวิธีการทำ sequencing ที่สามารถทราบได้ในทันทีที่มีการใช้นิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างสาย DNA เรียกว่า iterative pyrosequencing โดยหลังจากที่ dNTP แต่ละตัวเกาะกับสายของ DNA ได้สำเร็จแล้ว จะปล่อยหมู่ pyrophosphate (PPi) ออกมา ซึ่งในส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในกระบวนการตรวจ

sequencing นี้ คือ ATP sulfurylase ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน PPi เป็น ATP แล้ว ATP ที่เกิดขึ้นนี้ จะไปกระตุ้นสารส่วนประกอบอีกชนิดหนึ่งชื่อว่า luciferase ซึ่งช่วยส่งผลให้สาร luciferin เปลี่ยนเป็น oxyluciferin ได้สำเร็จ และเกิดเป็นแสงที่สามารถมองเห็นได้ขึ้นมา ทำให้เครื่องสามารถตรวจจับสัญญาณคลื่นแสงนี้ และทำให้ทราบว่า กำลังมีการใช้ dNTP เพื่อสร้างสาย DNA ขึ้น จากนั้น จะมีการสร้างเป็นภาพแสดงลำดับชนิดของนิวคลีโอไทด์ขึ้นตามมา(22)

#### 4. Mutation and sequence conservation analysis

เป็นการนำลำดับการเรียงตัวของเบสที่ได้จากขั้นตอนการทำ DNA sequencing มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ของคนปกติ เพื่อดูตำแหน่งใดบ้างที่มีชนิดของเบสที่แตกต่างกัน แล้วสามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนด้วยหรือไม่ ซึ่งจะสามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีน และการทำงานตามมาได้



## บทที่ 3

### 3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นแบบ Cross-sectional study

### 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.2.1 ประชากรและตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่ รพ.จุฬาลงกรณ์ด้วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรและตัวอย่าง

#### 1. กลุ่มตัวอย่าง

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา

1. มีสัญชาติไทยและมีอายุ 20 ปีขึ้นไป
2. ได้รับการวินิจฉัยว่า มีภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลัน

3. สมัครใจเข้าร่วมการศึกษาและลงชื่อในใบยินยอมเข้ารับการศึกษา โดยผู้เข้าร่วมวิจัยจะต้องมีระดับการรู้สติที่สมบูรณ์ในการตัดสินใจในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ หรือหากมีระดับการรู้สติที่ไม่สมบูรณ์ในการตัดสินใจ จะต้องเป็นผู้ชอบธรรมตามกฎหมายของผู้เข้าร่วมวิจัยให้การยินยอมแทน

กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา

1. ผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือดจากสาเหตุดังต่อไปนี้ ได้แก่ Embolic stroke, arterial dissection, hematologic disorders, vasculitis, congenital abnormal vessels, compression, trauma and malignancy

2. อายุมากกว่า 90 ปี

### 3.3 ขนาดตัวอย่าง

ใช้วิธีการคำนวณหาขนาดตัวอย่างเพื่อประมาณสัดส่วนของประชากร โดยใช้สูตร ดังนี้(23)

$$N = \frac{Z_{\alpha/2}^2 * P * (1-p) * D}{E^2}$$

P = สัดส่วนของโรคต่อประชากร = 0.04 (โดย Choi และคณะพบผู้ป่วยที่เป็น CADASIL 6 คนจากผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดทุกคนจำนวน 151 คน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 4(18))

Z = ค่า Z จากตารางแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนดระดับความเชื่อ 95% ที่  $\alpha = 0.05$ ,  $Z_{\alpha/2} = 1.96$  (two tail)

E = acceptable margins of error = 8.6%

D = design effect = 10 (สำหรับ purposive sampling)

เมื่อแทนค่าดังกล่าว จะได้ค่า N = 199.4 ดังนั้น จำนวนกลุ่มตัวอย่าง = 200 คน

### 3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่เข้าได้กับ inclusion criteria และไม่มีข้อห้ามตาม exclusion criteria จะได้รับการอธิบายถึงรายละเอียดของการวิจัย และลงนามในใบยินยอม หากผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมยินยอมเข้าร่วมการวิจัย จะได้รับการตรวจเลือดเพื่อหาการกลายพันธุ์ของ NOTCH3 โดยแยกผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมออกเป็นกลุ่มที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ NOTCH3 และกลุ่มที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของ NOTCH3 จากนั้น จะมีการเก็บบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้อง การซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจทางห้องปฏิบัติการและตรวจภาพถ่ายของสมองและหลอดเลือดสมองด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าศึกษาดูปัจจัยที่สำคัญ

หลังจากนั้นจะมีการตรวจเลือดในปริมาณ 1 ซ้อนชา (ประมาณ 4-5 มิลลิลิตร) โดยเก็บในหลอดพลาสติกชนิดสุญญากาศ เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *NOTCH3* ของโครโมโซมคู่ที่ 19 โดยส่งตรวจห้องปฏิบัติการนอกสถานที่ (หน่วยประสาทวิทยา โรงพยาบาลรามธิบดี ชั้น 7 อาคาร 1) โดยนายแพทย์อรรคพล พินิจจินดาทรัพย์ และเลือดที่เหลือจากการตรวจจะถูกทำลายทิ้งทันที

รายละเอียดของขั้นตอนการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3*

#### 1).DNA Extraction

- ปั่นเลือดที่บรรจุหลอดด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- นำสาร supernatant (plasma) ที่ได้จากการปั่นแยกออกมาอย่างระมัดระวัง
- นำชั้นสาร buffy coat ใส่หลอดขนาด 15 ซีซี และผสมสาร Lysis buffer แล้วผสมด้วยการเอียงไปมา นาน 10 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกจนหมด
- นำมาทำการปั่นต่อด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที จะพบว่ามีสารที่ขาวที่ก้นหลอด ให้เอียงเทสารน้ำออกไปอย่างระมัดระวัง แล้วใส่สาร lysis buffer อีกครั้งเพื่อทำขั้นตอนที่ 3 และ 4 อีกครั้ง
- นำน้ำบริสุทธิ์ปริมาณ 1 ซีซี ผสมกับ 50  $\mu$ l WBC lysing solution จนได้ปริมาณ 15 ซีซี แล้วเขย่า ตามด้วยผสม 25  $\mu$ l 10% SDS และ 25  $\mu$ l 10 mg/ml proteinase K. แล้วจึงผสมด้วย vortex
- นำมาอบค้ำคืนในอุณหภูมิ 56°C ความหนืดของสารลดลง เนื่องจากได้ lysis cell ไปแล้ว
- ผสมด้วยอัตราส่วนเท่าๆกันกับ phenol (ผสมกับ 0.1 M TrisHCl). 1.5 ซีซี แล้วนำไปผสมต่อโดยการเอียงหลอดไปมา นาน 10 นาที แล้วจึงนำมาทำการปั่นต่อด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที
- นำชั้นสารน้ำที่อยู่ด้านบนมา 1.5 ซีซี แล้วผสมกับ chloroform นำไปผสมต่อโดยการเอียงหลอดไปมา นาน 10 นาที แล้วจึงนำมาทำการปั่นต่อด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที

- นำชั้นสารน้ำที่อยู่ด้านบนมา 1.5 ซีซี แล้วผสมกับ 1/10 ของ 3 M Sodium acetate ผสมโดยใช้ pipetting แล้วจึงใส่ 100% ethanol นำไปผสมต่อโดยการเอียงหลอดไปมาจน DNA ตกตะกอน
- แล้วจึงนำมาทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที เพื่อแยก DNA
- ค่อยๆเท 100% ethanolออก และผสม 1 ซีซีของ 70% ethanol เพื่อล้าง DNA แล้วจึงนำมาเขย่าและทำการปั่นต่อที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที
- ค่อยๆเท 100% ethanolออก แล้วทิ้ง DNA ให้ติดกันหลอดไว้ เป่าลมจนกระทั่ง ethanol ระเหยหมด
- ล้างต่อด้วยน้ำบริสุทธิ์
- แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้ DNA แยกออกมา

## 2) NOTCH3 Mutation amplifying and sequencing with specific primers

NOTCH3 exon 3, 4 and 11 in all samples were amplified by forward and reverse primer as followed below;

ตารางที่ 1 แสดง forward primer และ reverse primer ที่ใช้ใน exon 3, 4 และ 11

<i>Exon of NOTCH3</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
3	5'-GAACTCCTGACCCCAAGTGA-3'	5'-GATCTGGCAGGGAGCAGTC-3'
4	5'-TGAGAGGGGAAGAGTCTGGA-3'	5'-AAGGATGGTCACCGCCGG-3'
11	5'-AGGGCCTCAGATAGAG-3'	5'-TTCCCAAACCCTCTGTG-3'

## 3) PCR Reaction

## ส่วนประกอบสำหรับการทำ PCR

— Sterile water	18.8	ไมโครลิตร
— 10x reaction buffer	3	ไมโครลิตร
— 2 mM dNTPs	2.5	ไมโครลิตร
— 25 mM MgCl <sub>2</sub>	2	ไมโครลิตร
— 20 uM F primer	0.25	ไมโครลิตร
— 20 uM R primer	0.25	ไมโครลิตร
— Taq polymerase (Fermentas)	0.20	ไมโครลิตร
— DNA template [100ng/ul]	3	ไมโครลิตร
รวม	30	ไมโครลิตร

## ขั้นตอนการทำ PCR Condition (Touch down PCR)

— Initial Denature	95°C	5	min	
— Denature	95°C	45	sec	} 11 รอบ
— Annealing	Decrease 1°C/cycle from 68-58°C	45	sec	
— Extension	72°C	30	sec	
— Denature	95°C	45	sec	} 22 รอบ
— Annealing	58°C	45	sec	
— Extension	72°C	30	sec	
— Final Extension	72°C	5	min	

ขนาดของ PCR ที่ได้จาก exon 3, 4 และ 11 ได้แก่ 438, 491 และ 390 คู่เบส ตามลำดับ  
แล้วนำมาทำ 1.2% gel electrophoresis เพื่อแยกก่อนจะนำมาตรวจสอบและ sequencing ด้วย



primer ทั้ง 2 อันโดย Macrogen Inc.ที่ประเทศเกาหลี DNA sequencing ดังกล่าวจะถูกเทียบกับ human *NOTCH3* genome reference (NC\_000019.10) โดยใช้ BioEdit software.

ขนาดตัวอย่างของผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลันที่เข้ารับการรักษาทั้งที่หอผู้ป่วยใน และแผนกผู้ป่วยนอกของ รพ.จุฬาลงกรณ์เป็นจำนวน 200 คน

### 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

#### 3.5.1 การสรุปข้อมูลและการนำเสนอข้อมูล

-ข้อมูลเชิงคุณภาพ ได้แก่ เพศ การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา ประวัติการเป็นโรคเบาหวาน, ความดันโลหิตสูง, ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ข้อมูลอื่นชนิดต่างๆ โดยสรุปเป็นร้อยละและนำเสนอข้อมูลโดยใช้ตารางและรูปภาพ

-ข้อมูลเชิงปริมาณ สรุปเป็นค่าเฉลี่ย และนำเสนอข้อมูลโดยใช้ตาราง

#### 3.5.2 การทดสอบสมมติฐาน

Chi-square test, Fisher Exact test

### 3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย

ประชากรกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว เป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เท่านั้น และการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของ *NOTCH3* เพียงบาง exon อาจส่งผลให้ไม่สามารถเป็นตัวแทนของประชากรผู้ป่วยทั้งหมดในประเทศ

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1. ประชากรที่นำมาศึกษา

ประชากรเข้าร่วมงานวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองขาดเลือดเฉียบพลัน ที่มารับการในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคม 2558 ถึง กุมภาพันธ์ 2559 ที่อยู่ในเกณฑ์การเข้าร่วมการศึกษาและยินยอมเข้าร่วมการรักษา จำนวนทั้งหมด 196 ราย โดยได้มีการคัดผู้ป่วยออกจากโครงการ 1 ราย เนื่องจากได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคเส้นประสาทอักเสบในช่วงระหว่างรักษาอยู่ในโรงพยาบาล

#### 4.2. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่มีภาวะสมองขาดเลือดเฉียบพลันที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* เทียบกับผู้ป่วยสมองขาดเลือดเฉียบพลันที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ดังตารางที่ 2 และ 3 พบว่า อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน คือ 63.3 ปี (SD = 8.0) , เป็นเพศชาย 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.6 , เป็นโรคเบาหวานร้อยละ 33.3, เป็นโรคไขมันในเลือดสูงคิดเป็นร้อยละ 50, เป็นโรคความดันโลหิตสูงร้อยละ 16.7, ภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่อุดตันคิดเป็นร้อยละ 33.3, มีภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดขนาดเล็กคิดเป็นร้อยละ 66.6 อายุเฉลี่ยในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* คือ 63.0 ปี (SD = 1.0) , เป็นเพศชาย 110 ราย คิดเป็นร้อยละ 57.9, โรคเบาหวานร้อยละ 30.5, เป็นโรคความดันโลหิตสูงร้อยละ 16.8, เป็นโรคไขมันในเลือดสูงร้อยละ 65.2, สูบบุหรี่ร้อยละ 18.8, มีภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่อุดตันคิดเป็นร้อยละ 30.6, มีภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดขนาดเล็กคิดเป็นร้อยละ 62.8 โดยพบว่า ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอายุ ( $p = 0.21$ ), เพศ ( $p = 0.90$ ), โรคเบาหวาน ( $p = 1.00$ ), เป็นโรคไขมันในเลือดสูง ( $p = 0.60$ ), ภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่อุดตัน ( $p = 0.80$ ), มีภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดขนาดเล็ก ( $p = 0.69$ )

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

Characteristics	Total (n=196)
Age (year $\pm$ SD)	63.1 $\pm$ 14.3
Gender (men, %)	114 (58.1)
Risk factors	
Diabetes	60 (30.6)
Hypertension	33 (16.8)
Hyperlipidemia	123 (62.8)
Previous stroke	31 (15.8)
Smoking	35 (17.9)
TOAST classification	
LAA	76 (38.8)
SV	103 (52.6)
Undetermined	11 (5.6)
Family history	
Stroke	28 (14.3)
Migraine	5 (2.6)
Psychiatric problems	-
MRI findings	
Leukoencephalopathy	1 (0.8)
Subcortical infarcts	52 (38.0)
Microbleed	18 (14.1)
Site of large vessel stenosis	
ICA	24 (26.1)
CCA	2 (2.2)
ACA	2 (2.2)
MCA	32 (34.8)
PCA	10 (10.9)

SCA	3 (3.3)
PICA	2 (2.2)
BA	7 (7.6)
VA	10 (10.9)

หมายเหตุ ข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่ อายุ แสดงในตารางเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
ข้อมูลเชิงปริมาณแสดงเป็นจำนวน (ร้อยละ)

**ตารางที่ 3 แสดงเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มที่ตรวจพบและไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน  
NOTCH3**

Characteristics	Mutation (n=6)	No mutation (n=190)	Total (n=196)	P value
Age (year $\pm$ SD)	66.3 $\pm$ 8.0	63.0 $\pm$ 1.0	63.1 $\pm$ 14.3	0.21
Gender (men, %)	4 (66.6)	110 (57.9)	114 (58.1)	0.90
Risk factors				
Diabetes	2 (33.3)	58 (30.5)	60 (30.6)	1.00
Hypertension	1 (16.7)	32 (16.8)	33 (16.8)	1.00
Hyperlipidemia	3 (50.0)	120 (65.2)	123 (62.8)	0.60
Previous stroke	1 (16.7)	30 (15.8)	31 (15.8)	1.00
Smoking	-	35 (18.4)	35 (17.9)	-
Subtype of stroke				
LAA	2 (33.3)	74 (38.9)	76 (38.8)	0.80
SV	4 (66.6)	99 (52.1)	103 (52.6)	0.69
Undetermined	-	11 (5.8)	11 (5.6)	-
Family history				
Stroke	-	28 (14.7)	28 (14.3)	-
Migraine	-	5 (2.6)	5 (2.6)	-
Psychiatric problems	-	-	-	-
Magnetic resonance imaging (MRI) of brain				

Leukoencephalopathy	-	1 (0.8)	1 (0.8)	-
Subcortical infarcts	3 (60.0)	49 (57.7)	52 (38.0)	0.053
Microbleed	-	18 (14.1)	18 (14.1)	-

หมายเหตุ ข้อมูลที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.05)

ข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่ อายุ แสดงในตารางเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.3. ผลการตรวจทางพันธุกรรมเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH 3*

พบผู้ป่วยทั้งหมด 6 รายที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH 3* ที่สนใจ โดย 3 exons จากผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจยีนทั้งหมด 196 คน คิดเป็นความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในตำแหน่งที่สนใจนี้เท่ากับประมาณร้อยละ 3.06 โดยการศึกษาพบว่า เป็นเพศชาย 4 ราย เพศหญิง 2 ราย พบมีปัจจัยเสี่ยงเป็นโรคเบาหวาน 2 ราย, โรคความดันโลหิตสูง 1 ราย, เป็นโรคไขมันในเลือดสูง 3 รายและมีภาวะสมองขาดเลือดมาก่อน 1 ราย หากจำแนกตามชนิดของหลอดเลือดที่เกิดพยาธิสภาพพบว่า มีผู้ป่วย 2 รายมีภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่อุดตันและผู้ป่วย 4 รายมีภาวะสมองขาดเลือดจากเส้นเลือดขนาดเล็ก จากการตรวจสมองด้วยคลื่นสะท้อนแม่เหล็ก พบว่า มีผู้ป่วย 3 รายที่ตรวจพบ subcortical infarct ร่วมด้วยและไม่พบ leukoencephalopathy ในผู้ป่วยทั้ง 6 ราย ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลของผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3*

Case	Gender	Age	TOAST	Risk factors	Previous stroke	Family History of stroke	MRI findings	
							Subcortical infarct	LE
1	M	43	LAA	HLP	No	No	No	No
2	M	55	SV	DM	No	No	No	No
3	M	55	SV	DLP	No	No	Yes	No
4	F	90	SV	HT	No	No	-	-
5	M	65	SV	DM	Yes	No	Yes	No
6	F	90	LAA	HLP	No	No	Yes	No

หมายเหตุ M, male; F, female; LAA, large artery atherosclerosis; SV, small vessel disease; HLP, hyperlipidemia; DM, diabetic mellitus; HT, hypertension; LE, leukoencephalopathy

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* โดยพบว่า มีผู้ป่วย 1 รายตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* บน Exon 4 โดยมีการเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนของโปรตีน แต่ไม่เป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนอะมิโน cysteine ของ *NOTCH3* receptor ดังแสดงในรูปภาพที่ 2 ผู้ป่วยที่เหลืออีก 5 รายตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* บน Exon 11 โดยพบว่า มีผู้ป่วย 2 รายที่พบการเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์, ชนิดของกรดอะมิโน และเปลี่ยนแปลงจำนวนอะมิโน cysteine ดังแสดงในรูปภาพที่ 3 แต่ผู้ป่วยอีก 3 รายพบว่า มีการเปลี่ยนชนิดของเบสและชนิดของกรดอะมิโน โดยไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนอะมิโน cysteine ของ *NOTCH3* receptor ดังแสดงในรูปภาพที่ 7

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ที่ตรวจพบในผู้ป่วยแต่ละราย

Case	Exon	Genomic DNA	mRNA	Amino change	Mutation
1	4	Ch.19 c.8852 A>G Heterozygous	m.509 A>G	His170Arg	Known missense
2	11	Ch.19 c.13727 G>A Heterozygous	m.1670 G>A	Ala564Thr	Novel missense
3	11	Ch.19 c.13667 C>T Heterozygous	m.1630 C>T	Arg544Cys	Known missense
4	11	Ch.19 c.13667 C>T Heterozygous	m.1630 C>T	Arg544Cys	Known missense
5	11	Ch.19 c.13727 G>A Heterozygous	m.1670 G>A	Ala564Thr	Novel missense
6	11	Ch.19 c.13727 G>A Heterozygous	m.1670 G>A	Ala564Thr	Novel missense

หมายเหตุ Ch, chromosome; A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, thymine; Ala, alanine; Arg, arginine; Thr, threonine; Cys, cysteine

จากการตรวจหากลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วยภาวะสมองขาดเลือดชาวไทย พบว่า มีผู้ป่วย 22 และ 20 ราย ที่ตรวจพบการเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ใน exon 3 ในลักษณะ homozygous และ heterozygous ตามลำดับ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน และมีผู้ป่วย 153 และ 40 ราย ที่ตรวจพบการเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ใน exon 4 ในลักษณะ homozygous และ heterozygous ตามลำดับ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน สำหรับ exon 11 พบว่า มีเพียง 2 และ 20 รายที่ตรวจพบการเปลี่ยนชนิดของเบส ในลักษณะ homozygous และ heterozygous ตามลำดับ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเบสบางตำแหน่งบนยีน *NOTCH3* ที่พบในผู้ป่วยชาวไทย

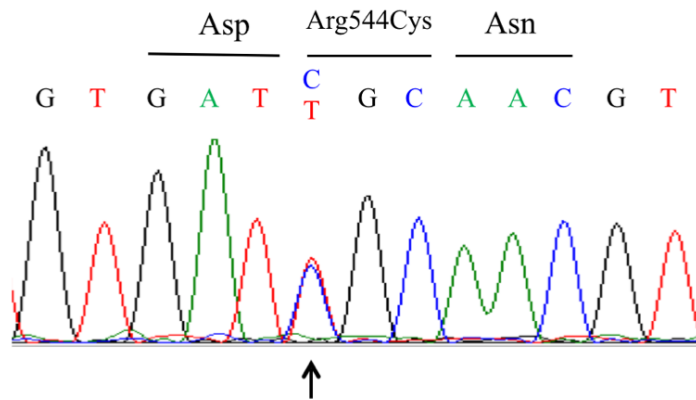
Exon	Genomic DNA	mRNA	Amino change	Mutation	Case (%)
3 (n=196)	Normal	Normal	No	No	154(78.6)
	Ch.19 c.8568 C>T Heterozygous	m.303 C>T	Thr101Thr	No	20(10.2)
	Ch.19 c.8568 C>T Homozygous	m.303 C>T	Thr101Thr	No	22(11.2)
4 (n=196)	Normal	Normal	No	No	3(1.5)
	Ch.19 c.8949 A>G Heterozygous	m.606 A>G	Ala202Ala	No	40(20.4)
	Ch.19 c.8949 A>G Homozygous	m.606 A>G	Ala202Ala	No	153(78.0)
	Ch.19 c.8852 A>G Heterozygous	m.509 A>G	His170Arg	Missense	1(0.5)
11 (n=196)	Normal	Normal	No	No	169(86.2)
	Ch.19 c.13657 G>T Heterozygous	m.1620 G>T	Thr101Thr	No	20(10.2)
	Ch.19 c.13657 G>T Homozygous	m.1620 G>T	Thr101Thr	No	2(1.0)
	Ch.19 c.13727 G>A Heterozygous	m.1670 G>A	Ala564Thr	Novel	3(1.5)
	Ch.19 c.13667 C>T Heterozygous	m.1630 C>T	Arg544Cys	Missense	2(1.0)

หมายเหตุ Ch, chromosome; A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, thymine; Ala, alanine; Arg, arginine; Thr, threonine; Cys, cysteine



ภาพที่ 3 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบส และจำนวนกรดอะมิโน cysteine บน Exon 11 ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วย

### NOTCH3 Exon 11



Ch.19 c.13667 C>T (Heterozygous)

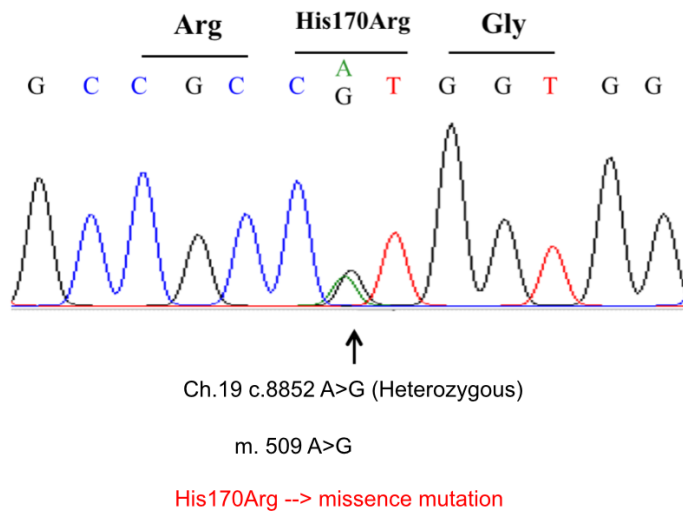
m. 1630 C>T

Arg544Cys --> Known missense mutation

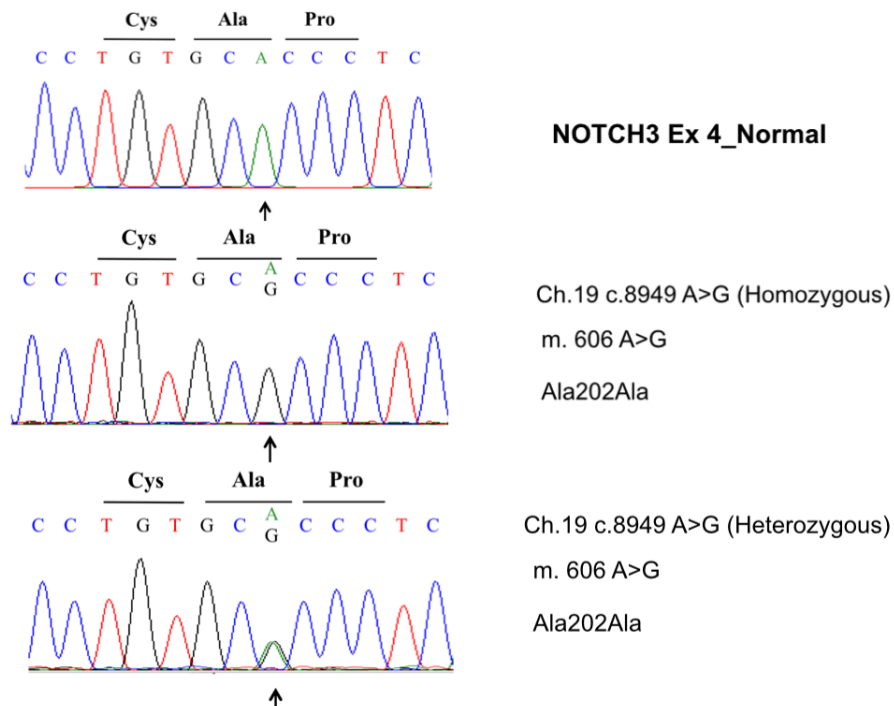


ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนของชนิดกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ cysteine บน Exon 4 ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วย

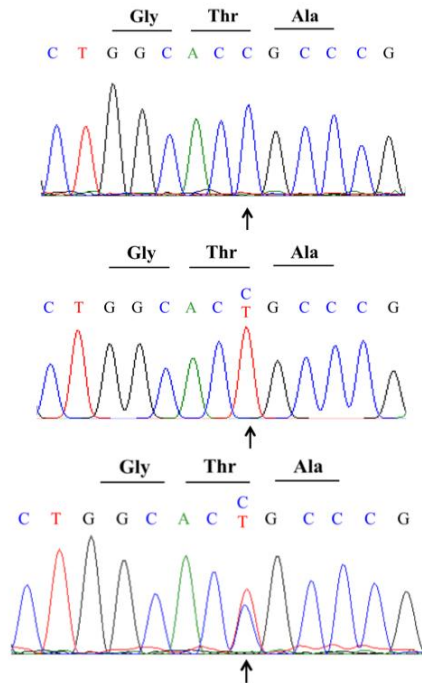
### NOTCH3 Exon 4



ภาพที่ 5 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบสที่ไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบน Exon 4 ของยีน *NOTCH3*



ภาพที่ 6 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบสที่ไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบน Exon 3 ของยีน *NOTCH3*



#### NOTCH3 Ex 3\_Normal

Ch.19 c.8568 C>T (Homozygous)

m. 303 C>T

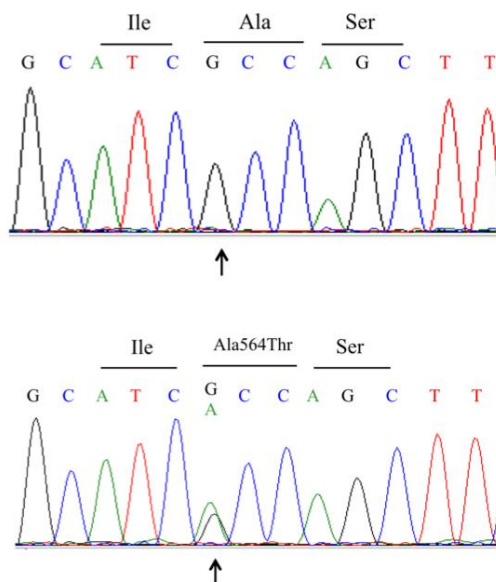
Thr101Thr

Ch.19 c.8568 C>T (Heterozygous)

m. 303 C>T

Thr101Thr

ภาพที่ 7 แสดงการเปลี่ยนของชนิดกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ cysteine บน Exon 11 ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วย



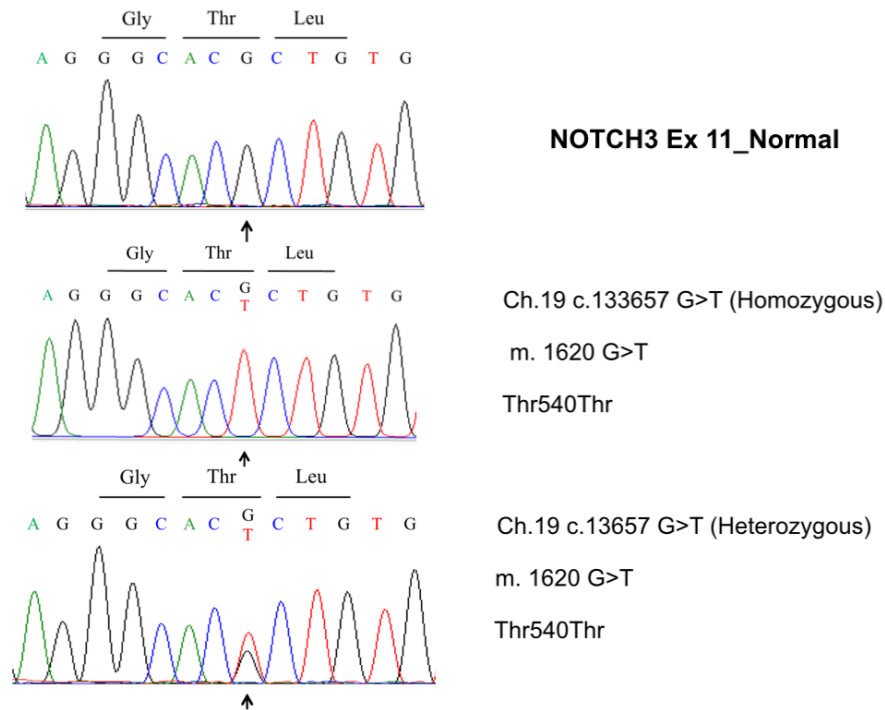
#### NOTCH3 Ex 11\_Normal

Ch.19 c.13727 G>A (Heterozygous)

m. 1670 G>A

Ala564Thr --> Novel mutation

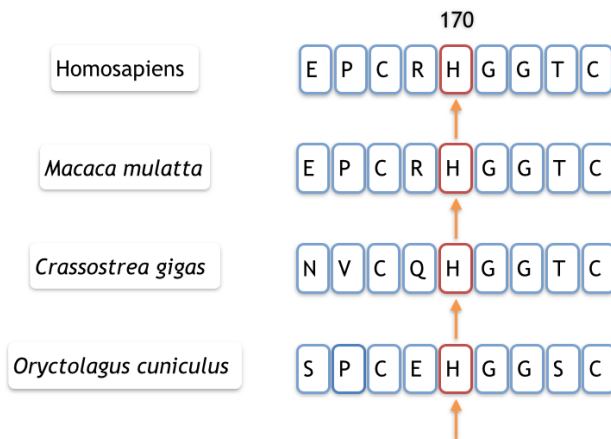
ภาพที่ 8 แสดงการเปลี่ยนของชนิดของเบสที่ไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบน Exon 11 ของยีน *NOTCH3*



นิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลง (variant) ที่ทำให้รหัสของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (missense) โดยไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนกรดอะมิโน cysteine ของยีน *NOTCH3* ใน exon 4 และ 11 ทั้ง 2 ตำแหน่ง (His170Arg, Ala564Thr) เมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในบริเวณรอบๆ ตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงในโปรตีน Notch3 receptor ของมนุษย์กับโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน หรือเหมือนกัน (homolog) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่า ในบริเวณดังกล่าว ทั้งสองตำแหน่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นลักษณะลำดับจำเพาะตรงกันในเรื่องสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน น่าจะแสดงถึงความสำคัญของการเรียงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าว ทำให้มีการเรียงลำดับในทุกลำดับแบบนี้โดยไม่มี การเปลี่ยนแปลงในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปภาพที่ 9 และ 10

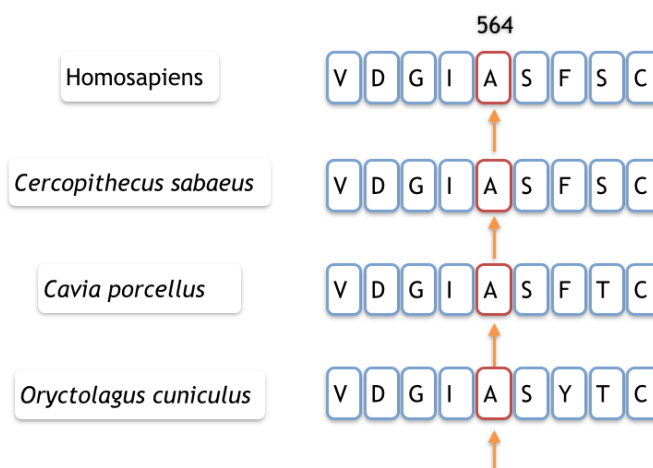
ภาพที่ 9 แสดงการเรียงตัวของกรดอะมิโนอย่างคงที่ของ *NOTCH3* ที่ตำแหน่ง 170 ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

### Sequence conservation of *NOTCH* homolog protein 3



ภาพที่ 10 แสดงการเรียงตัวของกรดอะมิโนอย่างคงที่ของ *NOTCH3* ที่ตำแหน่ง 564 ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

### Sequence conservation of *NOTCH* homolog protein 3



## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผล

จากการศึกษานี้ พบว่า ผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดส่วนใหญ่เกิดจากพยาธิสภาพที่หลอดเลือดสมองขนาดเล็กและสัมพันธ์กับโรคไขมันในเลือดสูง รองลงมา ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคสมองขาดเลือดในประชากรชาวไทย ก่อนหน้านี้ที่พบว่า ผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดส่วนใหญ่เกิดจากพยาธิสภาพที่หลอดเลือดสมองขนาดเล็กและสัมพันธ์กับโรคไขมันในเลือดสูงและโรคความดันโลหิตสูง (24)

การศึกษานี้ได้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ใน exon 3, 4 และ 11 โดยพบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ใน exon 4 และ 11 รวมทั้งหมด 6 รายในผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดที่เข้ารับการตรวจ 196 ราย ซึ่งคิดเป็นความชุกในการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ได้ร้อยละ 3.06 ซึ่งมีส่วนสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดชาวเกาหลี 151 ราย โดยวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ใน exon 3, 4, 6, 11 และ 18 ตรวจพบว่า มีผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* เฉพาะใน exon 11 รวม 6 ราย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 4 ของผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดที่ทำการศึกษา(18)

การศึกษานี้ พบว่า ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ส่วนใหญ่ตรวจพบโรคไขมันในเลือดสูงและเป็นโรคของหลอดเลือดสมองขนาดเล็ก แต่ไม่มีประวัติโรคสมองขาดเลือดและอาการปวดศีรษะไมเกรนมาก่อน ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลที่พบในผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดชาวเกาหลี โดยผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ส่วนใหญ่ตรวจพบโรคความดันโลหิตสูง, มีประวัติเคยเป็นโรคหลอดเลือดสมองมาก่อนและมีหลอดเลือดสมองขนาดใหญ่ตีบ(18) ผลงานวิจัยนี้ยังมีส่วนที่คล้ายกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในผู้ป่วยโรค CADASIL และคนในครอบครัวที่มีรายงานรวบรวมมาจากประเทศในทวีปยุโรปและเอเชีย ซึ่งพบว่า ส่วนใหญ่ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะแบบไมเกรนที่มีอาการนำและเป็นโรคสมองขาดเลือดจากหลอดเลือดขนาดเล็ก(15) นอกจากนี้ ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยจากการศึกษานี้ ได้แก่ เพศ อายุ รวมทั้งปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคไขมันในเลือดสูง โรคสมองขาดเลือดและการสูบบุหรี่ ลักษณะหลอดเลือดสมองตีบที่ตรวจพบ ไม่มีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* และกลุ่มที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* โดยครอบครัวของผู้ป่วยที่ตรวจพบ missense mutation ของยีน *NOTCH3* ใน exon 4 และ 11 พบว่า ไม่มีประวัติภายในครอบครัวเกี่ยวกับโรคพวดศีรษะไมเกรน โรคสมองขาดเลือด และภาวะผิดปกติทางจิตเวช ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ทำการศึกษาเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดชาวเกาหลี โดยพบประวัติโรคสมองขาดเลือดภายในครอบครัวเพียงร้อยละ 16.7 และไม่พบภาวะผิดปกติทางจิตเวชภายในครอบครัว(18) การที่ผู้ป่วยในการศึกษานี้ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* แต่ไม่มีประวัติอาการของโรค CADASIL ภายในครอบครัวมาก่อน อาจเป็นผลจากการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ที่ส่งผลให้เกิดอาการเพียงเล็กน้อยในลักษณะ subclinical หรืออาจเป็นการถ่ายทอดทางพันธุกรรม autosomal dominant ที่ไม่ full penetrance ได้

ภาพถ่ายทางรังสีของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในการศึกษานี้ ส่วนใหญ่พบลักษณะการตายของเนื้อสมองเป็นหย่อมขนาดเล็ก แต่ไม่พบลักษณะ leukoencephalopathy ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในผู้ป่วยโรค CADASIL และคนในครอบครัวในทวีปยุโรปและเอเชีย รวมทั้งข้อมูลที่พบในผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดชาวเกาหลีที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* พบว่า ส่วนใหญ่ตรวจพบลักษณะการตายของเนื้อสมองเป็นหย่อมขนาดเล็กในหลายตำแหน่ง ร่วมกับพบลักษณะ leukoencephalopathy โดยเฉพาะในบริเวณส่วน temporal และ external capsule(18) ดังนั้น ลักษณะภาพถ่ายทางรังสีอาจไม่สามารถใช้เพื่อช่วยในการแยกผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดชาวไทยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ที่เข้าได้กับโรค CADASIL ออกจากผู้ป่วยที่มียีน *NOTCH3* ปกติได้

จากการศึกษานี้ พบว่า ผู้ป่วย 6 รายตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* โดยมี 2 รายที่มีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของกรดอะมิโน cysteine ของโปรตีน ซึ่งตรงกับข้อมูลของผู้ป่วยที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้และเป็นที่ยอมรับว่าสามารถทำให้เกิดโรค CADASIL ได้ และผู้ป่วยทั้ง 2 รายนี้ พบภาวะสมองขาดเลือดจากหลอดเลือดขนาดเล็กซึ่งสอดคล้องกับพยาธิสภาพที่พบได้ในโรค CADASIL ทั้งนี้ มีผู้ป่วยอีก 4 รายที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* โดยเป็นแบบ novel mutation 3 ราย และแบบ known mutation 1 ราย ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้งหมดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนกรดอะมิโน cysteine ของโปรตีนและยังไม่เคยมีข้อมูล

รายงานมาก่อนว่า สามารถก่อให้เกิดโรค CADASIL ได้อย่างไร แต่มีบางรายงานที่ช่วยสนับสนุนว่า อาจสามารถทำให้เกิดโรค CADASIL เนื่องจากตรวจพบการกลายพันธุ์ดังกล่าวในผู้ป่วยที่มีอาการและ ลักษณะทางภาพถ่ายรังสีที่เข้าได้กับโรค CADASIL(12) นอกจากนี้ ข้อเสนอสนับสนุนที่บ่งบอกได้ว่า การกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* แบบที่ไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนกรดอะมิโน cysteine ที่ตรวจพบในผู้ป่วย ทั้ง 4 รายจากการศึกษานี้เป็นการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคได้จริง เนื่องจากลักษณะการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 170 ใน exon 4 และตำแหน่ง 564 ใน exon 11 เป็นตำแหน่งที่มีชนิดของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันตลอดในสิ่งมีชีวิตหลากหลายสายพันธุ์ของการวิวัฒนาการสิ่งมีชีวิต ดังรูปภาพที่ 9 และ 10 ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น อาจส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน และก่อให้เกิดโรค CADASIL ได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในประชากรชาวไทยระหว่างผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดกับคนปกติมีความจำเป็นเพื่อช่วยยืนยันว่า mutation ที่ตรวจพบไม่ได้เป็นรูปแบบหนึ่ง ซึ่งอาจสามารถพบได้ในคนปกติ

ในการศึกษานี้ พบว่า มีผู้ป่วย 2 รายที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ร่วมกับการตรวจพบหลอดเลือดสมองเส้นใหญ่ตีบ โดยทั้ง 2 รายมีโรคความดันโลหิตสูง ไม่พบ leukoencephalopathy และตรวจพบ left MCA stenosis ร่วมกับการกลายพันธุ์ที่ไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนกรดอะมิโน cysteine ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลในบางรายงานที่พบในการตีบของหลอดเลือดสมองเส้นใหญ่ร่วมด้วยในผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* แบบที่มีอาการ ภาพถ่ายรังสีและลักษณะการกลายพันธุ์เข้าได้โรค CADASIL ในชาวเกาหลีบางราย โดยพบว่า เป็นโรคสมองขาดเลือด, ไม่มีโรคปัจจัยเสี่ยงทางหลอดเลือดตีบ, มีภาพถ่ายทางรังสีเป็น lacunes หลายตำแหน่ง และพบ right ICA stenosis ร่วมด้วย(18, 19) ดังนั้น การตีบของหลอดเลือดสมองเส้นใหญ่ที่พบในการศึกษานี้ อาจสามารถเป็นผลจากที่ผู้ป่วยมีโรคความดันโลหิตสูง หรือเป็นผลจาก novel mutation ที่ตรวจพบส่งผลให้เกิดหลอดเลือดใหญ่ในสมองตีบขึ้นได้

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในการศึกษานี้ พบว่า มี single nucleotide polymorphism ดังที่ตรวจพบชนิดของนิวคลีโอไทด์ใน exon 3 ของยีน *NOTCH3* ที่ตำแหน่ง 8568 บนโครโมโซมคู่ที่ 19 โดยเหมือนกับข้อมูลที่มีรายงานก่อนหน้านี้ แต่พบว่า ชนิดของนิวคลีโอไทด์ใน exon 4 และ 11 ของยีน *NOTCH3* ที่ตำแหน่ง 8949 และ 13657 ตามลำดับ ไม่เหมือนกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน แต่



ความแตกต่างของชนิดนิวคลีโอไทด์นี้ไม่เปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนของโปรตีน จึงไม่มีผลต่อการโครงสร้างและทำงานของโปรตีน

จากการศึกษานี้ พบว่า ผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* พบร่วมกับการมีโรคที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดอุดตัน ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และโรคไขมันในเลือดสูง โดยไม่มีประวัติปวดศีรษะไมเกรนมาก่อน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดชาวเกาหลีที่พบการกลายพันธุ์เข้าได้กับโรค CADASIL โดยพบว่า ตรวจเจอโรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวานร่วมด้วย(18) นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาเก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยโรค CADASIL ชาวอังกฤษและคนภายในครอบครัว รวม 127 ราย ในทั้งหมด 65 ครอบครัว พบว่า ผู้ป่วยโรค CADASIL ที่มีสมองขาดเลือด สัมพันธ์กับการพบโรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวาน และพบแนวโน้มของความสัมพันธ์สูงกว่าในผู้ป่วยโรค CADASIL ที่มีอาการปวดศีรษะไมเกรน แต่ความสัมพันธ์ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ(25) ดังนั้น ผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ที่มีรายงานทำให้เกิดโรค CADASIL ได้อาจสามารถมีบางส่วนเกี่ยวเนื่องกับการเพิ่มขึ้นของความเสี่ยงต่อการตรวจพบโรคต่าง ๆ ดังกล่าว ซึ่งอาจส่งผลต่อการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิดในผู้ป่วยโรค CADASIL และคนในครอบครัว สำหรับในผู้ป่วยตั้งครรภ์ที่เป็นโรค CADASIL ไม่มีข้อมูลจากการศึกษานี้ แต่มีรายงานก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยหญิงชาวฟินแลนด์ที่เป็นโรค CASASIL พบว่า มีภาวะครรภ์เป็นพิษหรืออาการผิดปกติทางระบบประสาท รวมประมาณ 48% ในช่วงตลอดการตั้งครรภ์(26) ดังนั้น ผู้ป่วยหญิงที่ได้รับการตรวจพบว่าเป็นโรค CADASIL และตั้งครรภ์อาจได้ประโยชน์จากการทำ genetic counseling และการได้รับคำแนะนำในการวางแผนครอบครัวก่อนการตั้งครรภ์

จากการศึกษานี้ ภาพถ่ายทางรังสีของผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือด ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ไม่มีลักษณะ microbleed แตกต่างจากข้อมูลการศึกษาในผู้ป่วยสมองขาดเลือดชาวเกาหลีที่เป็นโรค CADASIL ส่วนใหญ่ตรวจพบลักษณะ microbleed(18) และข้อมูลการศึกษาในผู้ป่วยโรค CADASIL บางรายงานที่ผ่านมา ตรวจพบ microbleed ได้ส่วนมากในบริเวณ thalamus และสัมพันธ์กับการพบการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ใน exon 4 และมีประวัติการใช้ยา antiplatelet มาก่อนหลายปี(27) ทั้งนี้ การพบ microbleed ในผู้ป่วยโรค CADASIL อาจจำเป็นต้องพิจารณาในกรณีที่ต้องได้รับยา anticoagulant หรือ antiplatelet เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับการเกิด intracerebral hematoma ในผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดที่ตรวจพบ microbleed ได้ (28,

29) นอกจากนี้ การศึกษานี้ ผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ไม่มีประวัติปวดศีรษะไมเกรนมาก่อน แตกต่างจากข้อมูลที่ผ่านมา ทั้งนี้ ในผู้ป่วยโรค CADASIL บางรายที่มีอาการปวดศีรษะไมเกรนมีรายงาน พบว่า การได้รับยา acetazolamide ช่วยเพิ่ม cerebral blood flow และอาจช่วยลดอาการกำเริบของไมเกรน(30, 31) ดังนั้น การตรวจพบโรค CADASIL ในผู้ป่วยที่มีอาการปวดศีรษะไมเกรนอาจได้ประโยชน์จากการใช้ยา acetazolamide เพื่อช่วยป้องกันอาการกำเริบของไมเกรนได้ เมื่อมีข้อมูลงานวิจัยช่วยสนับสนุนเพิ่มเติมมากขึ้น

## 5.2 สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้พบว่าความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ในผู้ป่วยชาวไทยเป็นโรคสมองขาดเลือดเฉียบพลันมีประมาณร้อยละ 3.06 และในผู้ป่วยที่เป็นโรคสมองขาดเลือด การใช้ลักษณะอาการและภาพถ่ายทางรังสีที่มีรายงานเข้าได้กับโรค CADASIL อาจไม่สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยแยกโรคได้อย่างชัดเจน การตรวจเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ยังคงจำเป็นเพื่อใช้วินิจฉัยโรค CADASIL ในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นโรคสมองขาดเลือด

## 5.3 ข้อดีของการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ cross-sectional สามารถทำได้ง่ายในการศึกษาข้อมูล ณ ช่วงเวลาหนึ่ง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการช่วยประเมินหารูปแบบของความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ได้

นอกจากนี้ การศึกษานี้เป็นการตอบคำถามปัญหาวิจัยที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือด ซึ่งมีความสำคัญและเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรชาวไทย โดยลักษณะอาการและภาพถ่ายทางรังสีของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* อาจไม่ตรงตามข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อน ทำให้อาจถูกมองข้ามในผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดทั่วไปได้ ทั้งนี้ ลักษณะ genotype ของ *NOTCH3* อาจสามารถใช้เป็น biomarker ของผู้ป่วยโรคสมองขาดเลือดได้ในอนาคต เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาข้อมูลที่มากพอ ทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ ผลการศึกษานี้อาจมีผลกระทบที่สำคัญ นำไปสู่การศึกษาในขนาดประชากรที่ใหญ่ขึ้นและสามารถทำการวิเคราะห์ในพื้นที่ทั้งหมดได้แล้วสามารถนำข้อมูลดังกล่าว มาใช้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาความเสี่ยงของโรคสมองขาดเลือดบางส่วนในประชากรชาวไทยได้ต่อไป

#### 5.4 ข้อดีของการศึกษา

การศึกษานี้มีกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็กและขาดกลุ่มควบคุมที่เป็นผู้ที่ไม่มีความผิดปกติของยีน *NOTCH3* และไม่ได้เปรียบเทียบ ดังนั้นการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ยีนทั้งหมดของยีน *NOTCH3* และไม่ได้วิเคราะห์ยีนอื่นๆที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสมองขาดเลือด จึงทำให้ไม่ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสมองขาดเลือดในประชากรชาวไทยได้

#### 5.5 ข้อเสนอแนะ

การกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH3* ดูเหมือนมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคสมองขาดเลือดในผู้ป่วยชาวไทยอยู่บ้าง การศึกษาที่มีกลุ่มตัวอย่างใหญ่ขึ้นและการตรวจหาทั้งยีน *NOTCH3* จะสามารถข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสมองขาดเลือดในประชากรชาวไทยได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Suwanwela C, Hongsaprabhas C. Fronto-ethmoidal encephalomeningocele. *J Neurosurg.* 1966 Aug;25(2):172-82.
2. Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Cadasil. *Lancet Neurol.* 2009 Jul;8(7):643-53.
3. Executive summary: Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care.* 2013 Jan;36 Suppl 1:S4-10.
4. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013 Jul;31(7):1281-357.
5. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001 May 16;285(19):2486-97.
6. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation.* 2014 Jun 24;129(25 Suppl 2):S102-38.
7. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia.* 2013 Jul;33(9):629-808.
8. Larner AJ. Screening utility of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA): in place of--or as well as--the MMSE? *Int Psychogeriatr.* 2012 Mar;24(3):391-6.
9. Kukull WA, Larson EB, Teri L, Bowen J, McCormick W, Pfanschmidt ML. The Mini-Mental State Examination score and the clinical diagnosis of dementia. *J Clin Epidemiol.* 1994 Sep;47(9):1061-7.
10. Andre C. CADASIL: pathogenesis, clinical and radiological findings and treatment. *Arq Neuropsiquiatr.* 2010 Apr;68(2):287-99.
11. Tikka S, Baumann M, Siitonen M, Pasanen P, Poyhonen M, Myllykangas L, et al. CADASIL and CARASIL. *Brain Pathol.* 2014 Sep;24(5):525-44.
12. Rutten JW, Haan J, Terwindt GM, van Duinen SG, Boon EM, Lesnik Oberstein SA. Interpretation of NOTCH3 mutations in the diagnosis of CADASIL. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Jun;14(5):593-603.
13. Suwanwela N, Srikiatkachorn A, Tangwongchai S, Phanthumchina K, Suwanwela N. Mutation of the Notch 3 gene in a Thai cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy family. *J Med Assoc Thai.* 2003 Feb;86(2):178-82.
14. Oh SI, Kim SH, Kim HJ. Massive Pontine Microbleeds in a Patient With CADASIL. *JAMA Neurol.* 2014 Aug 1;71(8):1048-9.
15. Pescini F, Nannucci S, Bertaccini B, Salvadori E, Bianchi S, Ragno M, et al. The Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) Scale: a screening tool to select patients for NOTCH3 gene analysis. *Stroke.* 2012 Nov;43(11):2871-6.
16. Kim Y, Choi EJ, Choi CG, Kim G, Choi JH, Yoo HW, et al. Characteristics of CADASIL in Korea: a novel cysteine-sparing Notch3 mutation. *Neurology.* 2006 May 23;66(10):1511-6.

17. Wang Z, Yuan Y, Zhang W, Lv H, Hong D, Chen B, et al. NOTCH3 mutations and clinical features in 33 mainland Chinese families with CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 May;82(5):534-9.
18. Choi JC, Lee KH, Song SK, Lee JS, Kang SY, Kang JH. Screening for NOTCH3 gene mutations among 151 consecutive Korean patients with acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013 Jul;22(5):608-14.
19. Choi EJ, Choi CG, Kim JS. Large cerebral artery involvement in CADASIL. *Neurology*. 2005 Oct 25;65(8):1322-4.
20. Ince B, Benbir G, Siva A, Saip S, Utku U, Celik Y, et al. Clinical and Radiological Features in CADASIL and NOTCH3 -Negative Patients: A Multicenter Study from Turkey. *Eur Neurol*. 2014 Jul 30;72(3-4):125-31.
21. Suwanwela N, Srikiatkachorn A, Tangwongchai S, Phanthumchina K. Mutation of the Notch 3 gene in a Thai cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy family. *J Med Assoc Thai*. 2003 Feb;86(2):178-82.
22. Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics*. 4th ed. New York: Garland Science; 2011.
23. Suresh K, Chandrashekar S. Sample size estimation and power analysis for clinical research studies. *J Hum Reprod Sci*. 2012 Jan;5(1):7-13.
24. Suwanwela NC. Stroke epidemiology in Thailand. *J Stroke*. 2014 Jan;16(1):1-7.
25. Singhal S, Bevan S, Barrick T, Rich P, Markus HS. The influence of genetic and cardiovascular risk factors on the CADASIL phenotype. *Brain*. 2004 Sep;127(Pt 9):2031-8.
26. Roine S, Poyhonen M, Timonen S, Tuisku S, Marttila R, Sulkava R, et al. Neurologic symptoms are common during gestation and puerperium in CADASIL. *Neurology*. 2005 Apr 26;64(8):1441-3.
27. Lesnik Oberstein SA, van den Boom R, van Buchem MA, van Houwelingen HC, Bakker E, Vollebregt E, et al. Cerebral microbleeds in CADASIL. *Neurology*. 2001 Sep 25;57(6):1066-70.
28. Lovelock CE, Cordonnier C, Naka H, Al-Shahi Salman R, Sudlow CL, Sorimachi T, et al. Antithrombotic drug use, cerebral microbleeds, and intracerebral hemorrhage: a systematic review of published and unpublished studies. *Stroke*. 2010 Jun;41(6):1222-8.
29. Dichgans M, Holtmannspotter M, Herzog J, Peters N, Bergmann M, Yousry TA. Cerebral microbleeds in CADASIL: a gradient-echo magnetic resonance imaging and autopsy study. *Stroke*. 2002 Jan;33(1):67-71.
30. Donnini I, Nannucci S, Valenti R, Pescini F, Bianchi S, Inzitari D, et al. Acetazolamide for the prophylaxis of migraine in CADASIL: a preliminary experience. *J Headache Pain*. 2012 Jun;13(4):299-302.
31. Park SA, Yang CY, Choi SS, Kim WH. Assessment of cerebral hemodynamics to acetazolamide using brain perfusion SPECT in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Clin Nucl Med*. 2011 Feb;36(2):158-9.

รายการอ้างอิง



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายอรรคพล พินิจจินดาทรัพย์

วันเดือนปีเกิด 29 กันยายน พ.ศ.2526 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานภาพ โสด

ตำแหน่งทางการศึกษาปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์ประสาท

วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

พ.ศ.2544 - 2550 นิสิตคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ.2551 - 2552 แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลสมเด็จพระพุทธชินราช จังหวัด  
พิษณุโลก

พ.ศ.2555 - 2557 แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ เฉลิม  
พระเกียรติ

จังหวัดปทุมธานี

พ.ศ.2558 - ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาประสาทวิทยา

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ.2550 แพทยศาสตร์บัณฑิต

พ.ศ.2557 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรม

สาขาอายุรศาสตร์

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

