บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

ความรู้พื้นฐานที่ควรรู้ในการศึกษาครั้งนี้ มีดังนี้ คือ

- โรคกล้ามเนื้อเสื่อม
    - โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์ (DMD/BMD)
        - โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน
        - โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดเบกเกอร์
    - พยาธิกำเนิด
    - โปรตีนดิสโทรฟิน
    - การวินิจฉัยโรค
    - การรักษา
    - พันธุศาสตร์ของ DMD/BMD
    - โรคกล้ามเนื้อเสื่อมอื่นๆที่ใกล้เคียง
    - การศึกษาโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์
- การแยกโครโมโซมดีเอ็นเอสายยาว
- พอลิเมอเรสเชนรีแอกชัน
- ยีนดิสโทรฟินและมัลติเพลกซ์ พีซีอาร์

<u>โรคกล้ามเนื้อเสื่อม</u>

<u>โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์ (DMD/BMD)</u>

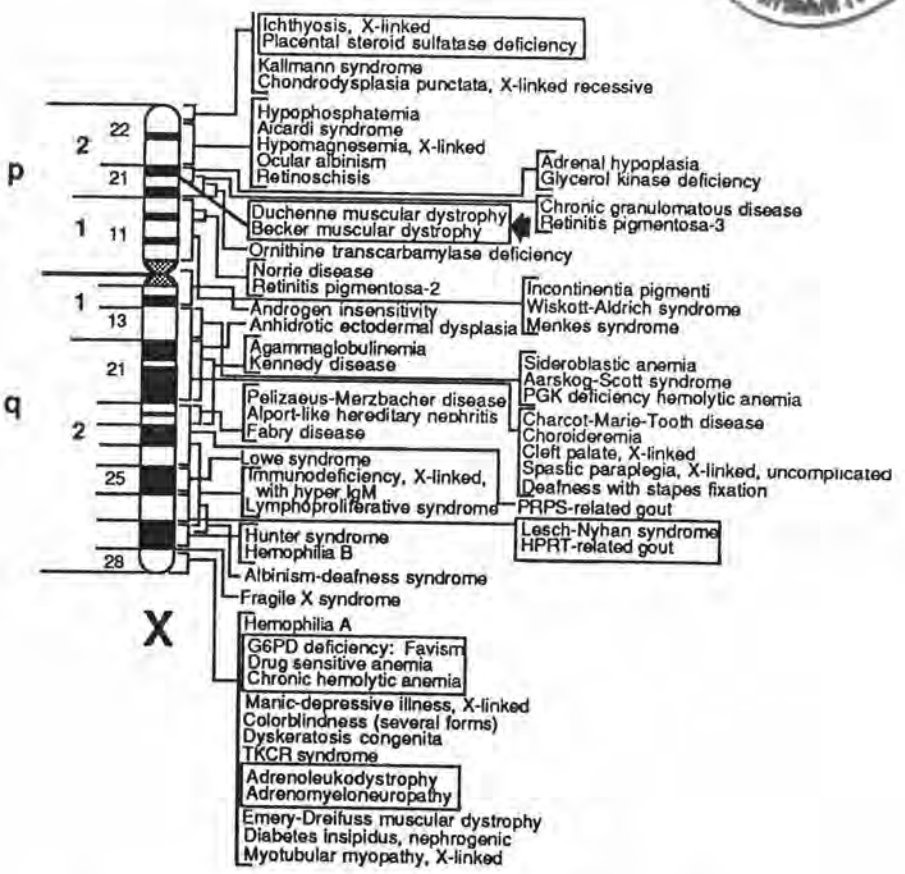
Moser (1984) รายงานว่า โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ดูเชน/เบกเกอร์ มีอุบัติการ 1 ราย ในทารกชายแรกเกิดที่มีชีวิตรอด 3500 ราย ในขณะที่โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดเบกเกอร์ จะมีความรุนแรงน้อยกว่า และมีความถี่ของการพบน้อยกว่า ทั้งสองโรคนี้เกิดจากการเกิดมิวเตชันของยีนดิสโทรฟีน ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์ แขนข้างสั้น บริเวณที่ 2 แถบที่ 1 (Xp21) ดังภาพ ที่ 1 (Hoffman และ Kunkel, 1989)

โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน (DMD)

ในปี ค.ศ. 1852 Meryon และ ปี ค.ศ. 1853 Little ได้เคยบันทึกอาการของผู้ป่วย DMD ไว้ แต่ดูเชน (Duchenne) เป็นผู้ที่ศึกษาผู้ป่วยอย่างละเอียด โดยได้กล่าวถึงอาการ การดำเนินของโรค เกณฑ์การวินิจฉัยโรค และผลตรวจการตัดชิ้นเนื้อในปี ค.ศ. 1861 และ ค.ศ. 1868 ดังนั้นจึงได้รับเกียรติให้ เรียกชื่อโรคนี้ว่า โรคกล้ามเนื้อเสื่อมดูเชน (Duchenne Muscular Dystrophy)

อีกประมาณ 20 ปีต่อมา Gowers ได้ตั้งข้อสังเกตผู้ป่วย พบท่าทางของผู้ป่วยที่จะต้องใช้มือ และแขนยันตัวเองขึ้นจากพื้น เริ่มด้วยท่าคุกเข่าแขนยันเหยียดตรง (ท่าคลานเข่า) จากนั้นจะใช้มือและเท้ายึดตรึงกับพื้น และพยายามเหยียดเข่า 2 ข้างยกสะโพกสูงขึ้นจนเหยียดเข่าตรงได้ จากนั้นจะค่อยเลื่อนมือเข้ามาหาข้อเท้า และใช้มือยันบริเวณหัวเข่าทีละข้าง แล้วค่อย ๆ ขยับมือเลื่อนสูงขึ้นตามหน้าขาเพื่อให้ยืดตัว เหยียดสะโพกจนยืนขึ้นในที่สุด ปัจจุบันเรียกอาการดังกล่าวนี้ว่า โกเวอร์ ไซน์ (Gowers' sign) (จินตนา ศิรินาวิน, 2536)

โรค DMD ทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อได้ตั้งแต่เกิด กล่าวคือ ผู้ป่วยจะมีระดับเอ็นไซม์ในกล้ามเนื้อสูงกว่าปกติ ร่วมกับมีกล้ามเนื้อฝ่อลีบมาตั้งแต่ระยะแรกคลอด แต่อาการทางคลินิกจะปรากฏให้เห็นก็เมื่อผู้ป่วยเข้าสู่วัยเด็ก เริ่มด้วยมีพัฒนาการที่ช้า เดินหรือขึ้นบันไดได้ลำบาก หกล้มบ่อย และน่องโต เมื่อผู้ป่วยอายุ



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนดิสโทรฟินบนโครโมโซมเอ็กซ์ อยู่ที่ตำแหน่ง Xp21 (ดังศรชี้) การขาดหายไปของยีนนี้ เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกล้ามเนื้อเสื่อม ชนิด ดูเชน/เบกเกอร์ (Duchenne/Becker muscular dystrophy)

(McKusick, *et al.*, 1992)

3-6 ปี ก็จะเห็น ลักษณะท่าเดินผิดปกติที่เรียกว่า "เดินเป็ด" (wadding) คือ จะเดินขาถ่าง หลังแอ่น พุงยื่น และบิดสะโพกไปมาตามจังหวะการก้าวเดิน เพราะมีอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อบริเวณข้อสะโพก เมื่อผู้ป่วยอายุได้ 5-6 ปี จะเห็นการขยายขนาดของกล้ามเนื้อบริเวณ น่อง แต่กล้ามเนื้อเหล่านี้มีลักษณะนิ่ม (flabby) และอ่อนแรง เพราะกล้ามเนื้อโป่งพอง เนื่องจากมีไขมัน และพังผืดเข้ามาแทรก (pseudohypertrophy)

กล้ามเนื้อที่มีอาการอ่อนแรงและลีบในระยะแรก จะเป็นมากที่กล้ามเนื้อบริเวณสะโพก (pelvic girdle) และกล้ามเนื้อบริเวณบ่าไหล่ (shoulder girdle) ต่อมาจึงเป็นที่กล้ามเนื้อบริเวณขา กล้ามเนื้อจะอ่อนแรงไม่เท่ากันทุกมัด เกิดการไม่สมดุลย์กัน จึงทำให้เกิดการดึงรั้งของกล้ามเนื้อ (contracture) ขึ้นที่บริเวณข้อเท้าจะอยู่ในท่าเขย่งบริเวณเข่างอ สะโพกงอ และขากางออก หลังแอ่นโค้งบริเวณเอว และมีกระดูกสันหลังคด เนื่องจากกล้ามเนื้อข้าง ๆ กระดูกสันหลัง 2 ข้างลีบไม่เท่ากัน กระดูกสะบักโปนกางออก (winging of scapula) การทำลายของกล้ามเนื้อต่าง ๆ จะเป็นมากขึ้นเรื่อย ๆ จนในที่สุดผู้ป่วยจะเดินไม่ได้เมื่ออายุได้ประมาณ 10 ปี กล้ามเนื้อทั่วตัว จะลีบเล็กลงจนเห็นกระดูกโปนชัดมีลักษณะผิดรูป เนื่องจากหลังค่อมและคด และจะเป็น มากขึ้นเรื่อย ๆ รวมทั้งข้อติดยึด และในระยะท้ายของโรคจะมีการทำลายของกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจ ผู้ป่วยส่วนมากจะถึงแก่กรรม เนื่องจากมีภาวะระบบการหายใจล้มเหลว แต่ก็มีผู้ป่วยประมาณ 10 % อาจถึงแก่กรรมจากภาวะหัวใจล้มเหลว ทั้งนี้เพราะในโรค DMD จะพบการเปลี่ยนแปลงที่หัวใจร่วมด้วยค่อนข้างบ่อย เนื่องจากมีการเสื่อมลงของกล้ามเนื้อหัวใจ แล้วมีพังผืดเข้ามาแทนที่ นอกจากนี้ ยังพบความผิดปกติของอัตรา และจังหวะการเต้นของหัวใจ

โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดเบกเกอร์ (BMD)

Becker (1953) ได้ตั้งข้อสังเกตเกี่ยวกับอาการของผู้ป่วยที่คิดว่าเป็น DMD

บางรายว่ามีอาการไม่รุนแรง และต่อมาในปี ค.ศ. 1955 และ ค.ศ. 1962 ได้รายงานว่าน่าจะเป็นกลุ่มอาการใหม่ จึงเรียกว่า Becker muscular dystrophy (BMD) ซึ่งถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์เช่นเดียวกัน BMD มีอาการหลายอย่างคล้ายคลึงกับ DMD แต่ความรุนแรงน้อยกว่า ผู้ป่วยเริ่มมีอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อสะโพกก่อน ทำให้มีอาการเดิน วิ่ง ลุกขึ้นยืน หรือขึ้นบันไดได้ลำบาก อาการดังกล่าวพบได้ตั้งแต่อายุ 1-45 ปี โดยผู้ป่วย 75% เกิดอาการครั้งแรกในช่วงอายุระหว่าง 4-19 ปี ผู้ป่วยเพียง 28.5% จะมีอาการอ่อนแรงมากจนเดินไม่ได้ต้องอาศัยเก้าอี้เข็น เมื่ออายุเฉลี่ยประมาณ 30 ปี ซึ่งต่างกับ DMD ที่ผู้ป่วยจะมีอาการถึงระยะนี้ทุกราย และจะเดินไม่ได้เมื่ออายุเพียงประมาณ 10 ปี เท่านั้น นอกจากนี้แล้วยังมีอาการทางคลีนิกของผู้ป่วย BMD ที่ต่างจาก DMD บางประการ ดังตารางที่ 1

<u>พยาธิกำเนิด</u>

Monaco และ Kunkel (1986) สามารถแยกยีนนี้จากโครโมโซมเอ็กซ์ได้ และหาลำดับของยีนนี้ได้ในปีต่อมา การศึกษาในระยะต่อมา ทำให้ทราบว่า ยีนดิสโทรฟีนควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดที่เรียกว่า โปรตีนดิสโทรฟีน

ยีนดิสโทรฟีน มีขนาดใหญ่มากถึง 2,400 กิโลเบส หรือเกือบ 1 % ของโครโมโซมเอ็กซ์ในคน ประกอบด้วยส่วนที่เป็นรหัสควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ถึง 75 ตำแหน่ง (75 exon) แต่ส่วนใหญ่ของยีน (99.5%) เป็นส่วนที่ไม่มีรหัสในการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนดิสโทรฟีน mRNA ที่ได้จากการถอดรหัสจากยีนดิสโทรฟีนมีขนาด 24,000 นิวคลีโอไทด์ ส่วนโปรตีนดิสโทรฟีนซึ่งได้จากการแปลรหัสจาก mRNA ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3,600 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 427 กิโลดาลตัน โปรตีนดิสโทรฟีน เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งพบทั้งใน กล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle), กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle), เส้นเลือด (vascular), กล้ามเนื้อในลำไส้ (visceral smooth muscle) และ เส้นประสาท (neurone)

ตารางที่ 1 แสดงอาการทางคลีนิกเปรียบเทียบของผู้ป่วย DMD/BMD

	Duchenne muscular dystrophy (DMD)	Becker muscular dystrophy (BMD)
การถ่ายทอดทางพันธุกรรม	X-linked recessive	X-linked recessive
อายุที่เริ่มมีอาการ (onset)	ช่วงต้นของวัยเด็ก (อายุ 2-5 ปี)	ช่วงปลายวัยเด็ก, รวมถึงช่วงวัยรุ่น (อายุ 6-16ปี)
การดำเนินโรค	อาการเลวลงเรื่อย ๆ มักเดินไม่ได้เมื่ออายุประมาณ 11 ปี และถึงแก่กรรมเมื่ออายุประมาณ 20 ปี	อาการเลวลงช้า ๆ และเกิดช้ากว่า จะเดินไม่ได้เมื่ออายุประมณ 30 ปี และถึงแก่กรรม เมื่ออายุประมาณ 40 ปี
ความผิดปกติของกล้ามเนื้อ	กล้ามเนื้ออ่อนแรงบริเวณต้นแขน มักเริ่มที่ กล้ามเนื้อบริเวณสะโพก ก่อนการโป่งของน่องเนื่องจากไขมันสะสม มีการรั้งตึงของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรงตั้งแต่อายุน้อย	กล้ามเนื้ออ่อนแรงบริเวณต้นแขน มักเริ่มที่ กล้ามเนื้อ บริเวณสะโพก ก่อนการโป่งของน่องเนื่องจากไขมันสะสม มีการรั้งตึงของกล้ามเนื้อน้อยกว่า DMD มักเกิดช้าหลังจากเดินไม่ได้แล้ว
ความผิดปกติของคลื่นหัวใจ(ECG)	พบความผิดปกติของ ECG บ่อยแต่เกิดอาการน้อย	อาจผิดปกติในระยะท้ายของโรค
ระดับสติปัญญา	ปัญญาอ่อนในบางราย	ไม่ผิดปกติ
ลักษณะพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อ	มัดกล้ามเนื้อฝ่อลีบ และพบพังผืด	ลักษณะคล้ายกัน
พยาธิกำเนิด	ขาดโปรตีนดิสโทรฟิน พบได้ < 3% ของคนปกติ	โปรตีนดิสโทรฟินลดลง หรือมีลักษณะผิดปกติ

โปรตีนดิสโทรฟีน มีหน้าที่เกี่ยวกับการคงรูปร่างของเยื่อหุ้มเซลล์ ให้ทนต่อการหดตัว หากขาดโปรตีนดิสโทรฟีน เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อจะเกิดการรั่วได้ง่าย ทำให้มีแคลเซียมเข้าสู่เซลล์มากขึ้น ส่วนสารประกอบภายในเซลล์ ก็รั่วออกไปนอกเซลล์ โดยเฉพาะเอ็นไซม์ ครีเอทิน ฟอสโฟไคเนส (Creatine phosphokinase : CPK), จึงทำให้ตรวจพบระดับเอ็นไซม์ดังกล่าวได้สูงในซีรัม (serum) ของผู้ป่วย ปริมาณแคลเซียมที่รั่วเข้ามาในเซลล์ จะทำให้เกิดการกระตุ้นทำให้เซลล์ขาดพลังงาน ร่วมกับการที่มีเอ็นไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิดทำงานมากขึ้น นำไปสู่การเกิดการฝ่อลีบของเซลล์กล้ามเนื้อต่อไป

<u>โปรตีนดิสโทรฟีน</u>

เนื่องจากปริมาณโปรตีนดิสโทรฟีนในกล้ามเนื้อมีอยู่น้อยมาก จึงยากที่จะสกัดออกมาให้เห็น และวัดปริมาณได้โดยตรง การตรวจหาปริมาณของโปรตีนดิสโทรฟีนจึงต้องอาศัย แอนติบอดีประเภทโคลนเดี่ยว (monoclonal antibody) ต่อโปรตีนดิสโทรฟีน โดยวิธี อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescent) พบว่าภาพตัดขวางของเซลล์กล้ามเนื้อจากการตัดชิ้นเนื้อตรวจ ผลของคนปกติจะเห็น ขอบเขตของเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นลักษณะขอบเรียบสม่ำเสมอ ส่วนของผู้ป่วย DMD จะย้อมไม่ติดโปรตีนดิสโทรฟีนเลย และสำหรับผู้ป่วย BMD จะย้อมติด โปรตีนดิสโทรฟีน แต่มีลักษณะผิดปกติ (ติดบางไม่สม่ำเสมอ) ถ้าตรวจหาปริมาณของโปรตีนดิสโทรฟีน โดยวิธี เวสเทิร์น บล็อท (Western blot) จะพบว่าผู้ป่วย DMD มีปริมาณของโปรตีนดิสโทรฟีนอยู่น้อยมาก (<3% ของคนปกติ) ส่วนโปรตีนดิสโทรฟีนของผู้ป่วย BMD จะมีความผิดปกติของปริมาณ หรือคุณภาพของโปรตีนดิสโทรฟีน กล่าวคือ จากการศึกษาโดยวิธี อิมมูโน บล็อท (immunoblot) พบว่าผู้ป่วย BMD 80% จะมีโปรตีนดิสโทรฟีนขนาดเล็กกว่า 427 กิโลดาลตัน โดยที่ปริมาณของโปรตีนดิสโทรฟีนเป็น 20 - 100% ของใน

คนปกติ ผู้ป่วยอีก 5% มีโปรตีนดิสโทรฟินขนาดโตกว่าปกติ ส่วนในผู้ป่วยที่เหลืออีก 20% มีโปรตีนดิสโทรฟินขนาดเท่าปกติ แต่ปริมาณน้อยกว่าปกติ

การตรวจหาปริมาณของโปรตีนดิสโทรฟินนี้ จะใช้วินิจฉัยแยกโรคจากโรคกล้ามเนื้อเสื่อมอื่น ๆ ได้ เพราะโรคอื่นจะมีการย้อมโปรตีนดิสโทรฟินปกติ คือ พบทุกเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อ และติดสีสม่ำเสมอ) และเมื่อตรวจโดยวิธี อิมมูโน บล็อท พบว่าขนาดของโปรตีนดิสโทรฟินก็ปกติ

การตรวจโปรตีนดิสโทรฟินในคนที่เป็นพาหะของโรค DMD นั้น พบว่าทุกรายจะมีการติดสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ของแอนติบอดีต่อโปรตีนดิสโทรฟินผิดปกติ ทั้งในรายที่มีอาการ หรือไม่มีอาการ โดยรายที่มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงด้วย จะเห็นลักษณะโมซาอิก (mosaic) ของเซลล์กล้ามเนื้อ คือ บางเซลล์ย้อมติดโปรตีนดิสโทรฟิน บางเซลล์ก็ย้อมไม่ติด แต่คนที่เป็นพาหะของโรค ส่วนใหญ่ที่ไม่มีอาการจะไม่เห็นรูปแบบโมซาอิกแบบนี้ แต่จะเห็นลักษณะการติดสี อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดีต่อโปรตีนดิสโทรฟินไม่สม่ำเสมอ

<u>การวินิจฉัยโรค</u>

การวินิจฉัยโรคผู้ป่วย DMD และ BMD ดูจากอาการ และการแสดงทางคลีนิก ประวัติทางพันธุกรรม การตรวจเอ็นไซม์ CPK และการตัดชิ้นเนื้อตรวจ ในบางรายระดับ CPK ในผู้ป่วยจะสูงกว่าคนปกติ โดยในระยะแรกจะมีระดับสูงมากกว่าในระยะท้ายของโรค DMD ต้องวินิจฉัยแยกจากโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ลิมบ์ - เกอร์เดิล (limb - girdle) ซึ่งถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนออโตโซม บางรายมีอาการตั้งแต่เด็ก และเป็นไปอย่างรวดเร็ว โรคลิมบ์-เกอร์เดอร์ จะมีระดับ เอ็นไซม์ CPK สูงปานกลาง และคลื่นหัวใจจะปกติ

ส่วนโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด เอ็มเมอรี่-ดริฟฟัสส์ (Emery-Dreifuss) ถ่าย ทอดโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์ เริ่มมีอาการเมื่ออายุประมาณ 4-5 ปี โดยมีอาการอ่อนแรงที่กล้ามเนื้อบริเวณหน้าแข้ง อาการเป็นไปอย่างช้า ไม่มีกล้ามเนื้อโต

สำหรับผู้ป่วยชาย ที่เป็นโรคกล้ามเนื้อส่วนต้นของแขนขาเสื่อม ที่พบเพียงคนเดียวในครอบครัวที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคลิมบ์-เกอร์เดิล (sporadic limb girdle muscular dystrophy) เมื่อตรวจโปรตีนดิสโทรฟินแล้วพบว่า โดยความจริงแล้วเป็นโรค BMD นั่นคือวินิจฉัยผิดพลาด ถึง 31% ส่วนผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคกล้ามเนื้อส่วนต้นของแขนขาเสื่อมที่พบเพียงคนเดียวในครอบครัว วินิจฉัยผิดพลาดถึง 17 % ซึ่งความจริงแล้วเป็นพาหะของโรค DMD

ผู้ป่วย BMD บางรายอาจมีอาการบางอย่างซึ่งไม่บ่งชัดได้ เช่น มีอาการอ่อนแรง เฉพาะที่กล้ามเนื้อบริเวณต้นขา บางรายเป็นตะคริว และปวดกล้ามเนื้อ หรือบางรายมีอาการรุนแรงคล้ายกับ DMD คือ เดินไม่ได้ เมื่ออายุระหว่าง 14-20 ปี จัดว่าเป็น BMD ชนิดรุนแรง

<u>การรักษา</u>

การดูแลรักษาผู้ป่วย DMD/BMD มักเป็นการดูแลรักษาตามอาการ นอกจากนี้ก็ให้การดูแลรักษาเรื่องการติดเชื้อแทรกซ้อนของปอด และภาวะการหายใจล้มเหลว

ในปี ค.ศ. 1989 ได้มีการทดลองให้ยาเพร็ดนิโซโลน (prednisolone) รักษาผู้ป่วย DMD พบว่าได้ผลดีชั่วคราวแต่ผู้ป่วยมักทนฤทธิ์ข้างเคียงของยาไม่ได้ (จินตนา ศิรินาวิน, 2536) การรักษาโดยหวังแก้ไขความผิดปกติของโปรตีนดิสโทรฟินอาจกระทำได้โดยการทดแทนยีนที่ผิดปกติด้วยยีนปกติ (gene therapy) ซึ่งกำลังอยู่ในขั้นการทดลอง

โดยใส่ยีนดิสโทรฟิน หรือส่วนของยีน ฝากดีเอ็นเอพาหะ (vector DNA) เข้าไปในเซลล์ของผู้ป่วย แต่เนื่องจากยีนนี้มีขนาดใหญ่มากจึงยังเป็น ปัญหาในวิธีการทำ (Anderson, 1992 ; Miller, 1992) นอกจากนี้การรักษาโดยวิธีการ เอาเซลล์อ่อนของกล้ามเนื้อ (myoblast) ของคนปกติปลูกถ่ายเข้าไปในกล้ามเนื้อของผู้ป่วย พบว่ามีกล้ามเนื้อบางเซลล์สร้างโปรตีน ดิสโทรฟินขึ้นมาได้ การรักษาด้วยวธีนี้เป็นการกระทำที่ยุ่งยาก เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ให้และผู้รับต้องเข้ากันได้ นอกจากนี้ค่าใช้จ่าย ในการรักษา และบุคลากรทางการแพทย์ที่ทำการรักษาต้องมีประสบการณ์สูง วิธีนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการวิจัย

พันธุศาสตร์ของโรค DMD และ BMD

DMD และ BMD เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมที่มีอุบัติการสูงมาก ถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์ อุบัติการของ DMD เท่ากับ 1: 3500 ในเด็กเพศชายที่มีชีวิตรอด ซึ่งสูงกว่า BMD สิบเท่า

โรค DMD และ BMD พบในผู้ป่วยเพศชาย ซึ่งได้รับการถ่ายทอดยีนผิดปกติมาจากมารดาที่เป็นพาหะ แต่ผู้ป่วยประมาณ 1/3 เกิดจากมารดาที่ปกติ แต่เกิดมิวเตชันขึ้นภายหลัง

ในกรณีที่มารดาเป็นพาหะ อัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคในพี่น้องผู้ชายของผู้ป่วยเท่ากับ 1/2 และอัตราเสี่ยงต่อการเป็นพาหะในพี่น้องผู้หญิงเท่ากับ 1/2

หญิงที่มีลูกเป็นโรค หรือเป็นพาหะ 2 คน หรือมากกว่า หรือมีลูกเป็นโรค หรือเป็นพาหะ 1 คน และมีญาติทางมารดาเป็นโรค หรือเป็นพาหะ 1 คน หรือมากกว่า หรือมีบิดาเป็นโรค (ในกรณี BMD) จะบอกได้ว่าหญิงนั้นเป็นพาหะแน่นอน

การที่พบผู้ป่วยเป็นโรคแต่เพียงคนเดียวในครอบครัว นอกจากจะเป็นเพราะมิวเตชันเกิดขึ้นใหม่ดังกล่าวแล้ว ยังอาจเกิดจากมารดาเป็นพาหะก็ได้ ในรายที่มารดาเป็นพาหะ มารดาที่อาจเกิดมิวเตชันขึ้นใหม่ หรือได้รับถ่ายทอดยีนผิดปกติมาจากยายก็ได้ กรณีที่มีผู้ป่วยเป็นโรคแต่เพียงคนเดียวในครอบครัว มักเป็นปัญหายุ่งยากเสมอ ในการประเมินอัตราเสี่ยงในครอบครัว

การตรวจหาพาหะสำหรับ DMD และ BMD มีความสำคัญในการให้คำปรึกษา แนะนำทางพันธุศาสตร์ พาหะประมาณ 2/3 มีระดับเอ็นไซม์ CPK ในซีรัมสูงกว่าปกติ แต่ 1/3 อยู่ในเกณฑ์ปกติ เนื่องจากการถูกลดศักยภาพของโครโมโซมเอ็กซ์ (random X inactivate) ตามทฤษฎีของไลออน (Lyon' s hypothesis) ดังนั้นถ้าตรวจพบว่าสมาชิกครอบครัวที่เป็นหญิง มีค่าเอ็นไซม์ CPK ในซีรัม อยู่ในเกณฑ์ปกติ จะบอกไม่ได้ว่าเป็นพาหะหรือไม่ ในปัจจุบัน การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ช่วยให้การตรวจหาพาหะทำได้แม่นยำยิ่งขึ้น และสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคก่อนคลอดได้

ความผิดปกติที่ระดับอณูของ DMD และ BMD ในผู้ป่วยร้อยละ 55-65 เกิดจากการขาดหายไปของยีนบางส่วน และร้อยละ 5-10 เกิดจากการมีเบสบางส่วนซ้ำซ้อน (partial duplication) ซึ่งความผิดปกติทั้งสองกลุ่มนี้ ตรวจได้โดยการวิเคราะห์ ด้วยวิธีเซาเทิร์น บล็อท (Southern blot) (Southern, 1975) หรือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค พีซีอาร์ สำหรับผู้ป่วยที่นอกเหนือจากจำนวนนี้ เกิดจากมีเบสผิดปกติมาแทนที่เรียก พอยท์ มิวเตชัน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบชนิด และไม่สามารถตรวจหายีนผิดปกติที่เกิด จากกลไกนี้ได้โดยตรง แต่อาจตรวจหาได้ทางอ้อม โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของผู้ที่เกี่ยวข้อง ทั้งครอบครัว

สาเหตุที่ผู้ป่วยที่มีการขาดหายไปของยีน บางรายเป็น DMD และบางรายเป็น

BMD นั้น เนื่องจากว่า การขาดหายไปของยีนทำให้ยีนที่อยู่ในช่วงที่มีการอ่านรหัส (reading frame) ผิดปกติไป เกิดการอ่านรหัสต่อไปไม่ได้ หยุดการสร้างโปรตีนดิสโทรฟิน ผู้ป่วยก็จะเป็น DMD แต่ถ้าการขาดหายไปของยีนนั้น ไม่ทำให้ยีนที่อยู่ในช่วงที่มีการอ่านรหัสผิดไปจากปกติ แม้บางรหัสขาดหายไป แต่ก็ยังสามารถสร้างโปรตีนดิสโทรฟิน ได้บ้าง แต่มีกรดอะมิโนบางส่วนขาดหายไป ผู้ป่วยก็จะเป็น BMD (จินตนา ศิรินาวิน, 2536)

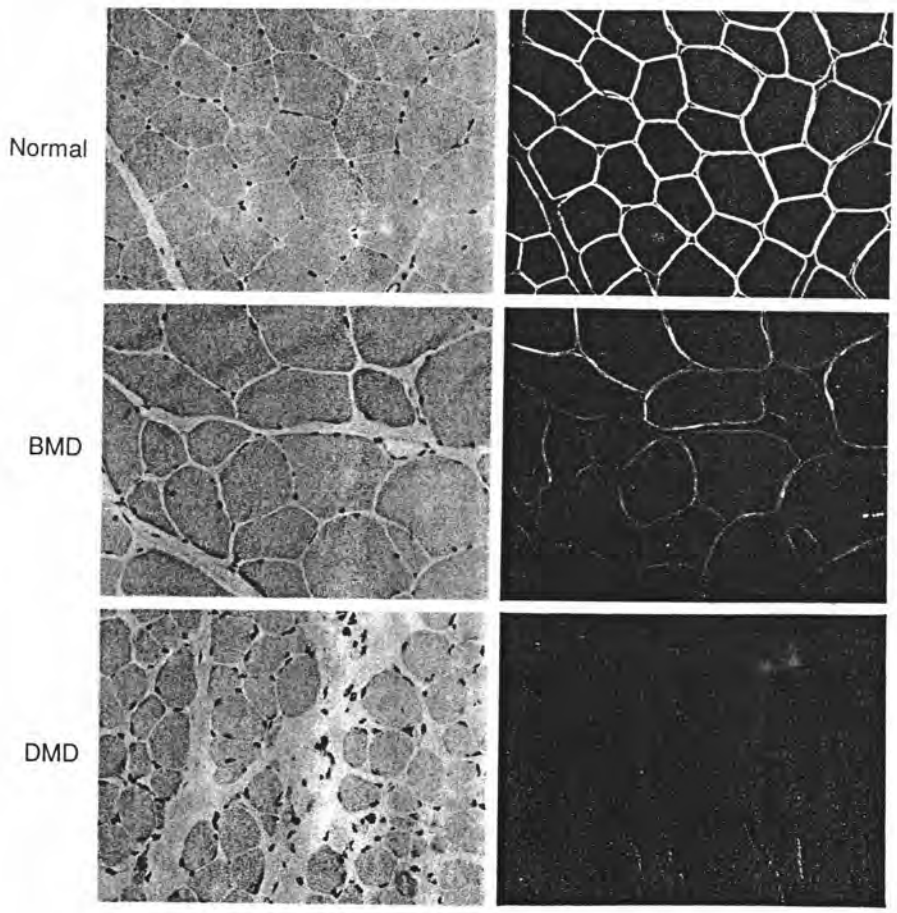
<u>โรคกล้ามเนื้อเสื่อมอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงโรค DMD</u>

-โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดเบกเกอร์ Becker muscular dystrophy

โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดนี้ มีการกล่าวถึง ในปี ค.ศ.1962 ว่าเป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมที่มีการถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์เหมือนโรค DMD และมีตำแหน่งของยีนที่ผิดปกติที่ Xp21 เช่นกัน แต่มีอาการเริ่มต้น ล่าช้ากว่า DMD และยังมีพัฒนาการของโรคช้ากว่าอีกด้วย ทำให้ผู้ป่วยสามารถเดินได้ปกติ จนถึงกลางหรือปลายระยะวัยรุ่น พบประมาณ 10% ของ DMD ทั้งหมด (Becker , 1964)

อาการของโรคเหมือน DMD แต่มีอาการเริ่มต้น และพัฒนาการของโรคช้ากว่า แต่เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุดเช่นกัน

ทางด้านพยาธิสภาพ จากการดูการตัดชิ้นเนื้อ ให้ผลคล้าย DMD แต่จำนวนของพังผืด (necrotic fibers) เมื่อดูจากภาพตัดขวางของชิ้นเนื้อ จะพบน้อยกว่า และเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ของแอนติบอดีต่อโปรตีนดิสโทรฟิน จะพบว่ามีการติดสีของ แอนติบอดีที่เฉพาะต่อโปรตีนดิสโทรฟิน น้อยกว่าใน DMD ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงการติดสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดี้ ต่อโปรตีนดิสโทรฟิน ในคนปกติ, โรคกล้ามเนื้อเสื่อมเบกเกอร์ และโรคกล้ามเนื้อเสื่อมดูเชน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ดิสโทรฟินมีน้อยใน BMD และเกือบไม่มีเลยใน DMD (Winchester, A.M. และคณะ, 1983)

-โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ลิมบ์-เกอร์เดอร์ (Limb-girdle muscular dystrophy) หรือ Leyden-Möbius disease

เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมอีกชนิดหนึ่งที่พบบ่อย มีการถ่ายทอดของโรคด้วยยีนด้อยบนออโตโซมเป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะมีอาการเริ่มต้นของโรคในวัยผู้ใหญ่ แต่พบมีบางรายมีการถ่ายทอดด้วยยีนเด่นบนออโตโซม (Harvey, 1983) กลุ่มอาการของโรคนี้พบโดย Leyden ในปี ค.ศ.1876 และ Möbius ในปี ค.ศ.1879

กลุ่มอาการของโรคนี้ ทำให้กล้ามเนื้อบริเวณสะโพกอ่อนแรง และมีการฝ่อลีบของกล้ามเนื้อ เนื่องจากการขาดเส้นประสาทไปเลี้ยง (atrophy) กล้ามเนื้อจะเสื่อมอย่างต่อเนื่อง โดยเป็นที่ส่วนต้นของกล้ามเนื้อแขน-ขา และรอบข้อต้นแขน รวมถึงเส้นประสาทที่มาเลี้ยงเสื่อมลงไปด้วย กล้ามเนื้อเชิงกราน จะได้รับผลกระทบมากกว่ากล้ามเนื้อรอบสะบัก (Harvey, 1983)

ผลทางพยาธิสภาพ จะมีความผันแปรสูง

-โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด เอ็มเมอรี่ - ดริฟฟัสส์ (Emery-Dreifuss muscular dystrophy หรือ X-linked Scapuloperoneal or Scapulohumeral)

Emery และ Dreifuss (1966) ได้รายงานเกี่ยวกับโรคนี้ และข้อมูลทางพยาธิสภาพของกล้ามเนื้อหัวใจเป็นกลุ่มแรกในปี ค.ศ. 1966 เมื่อเทียบกับโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด DMD/BMD จัดเป็นโรคที่พบไม่บ่อย มีการถ่ายทอดของโรคโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์

อาการเริ่มแรกเกิดในวัยเด็ก แต่ผู้ป่วยบางรายก็เริ่มมีอาการในวัยผู้ใหญ่เพราะมีพัฒนาการของโรคช้ามาก ทำให้ผู้ป่วยสามารถเดินได้จนถึงอายุประมาณ 50 ปี

ไม่มี pseudohypertrophy เหมือนใน DMD แต่จะมีการรั้งตึงของกล้ามเนื้อ

ความอ่อนแรงและการลีบของกล้ามเนื้อ เป็นที่บริเวณกล้ามเนื้อสะบัก และกล้าม เนื้อรอบกระดูกต้นขา (scapulohumeral or scapuloperoneal) มีซีรัม CPK สูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ DMD และไม่พบมีอาการปัญญาอ่อนเกิดขึ้น

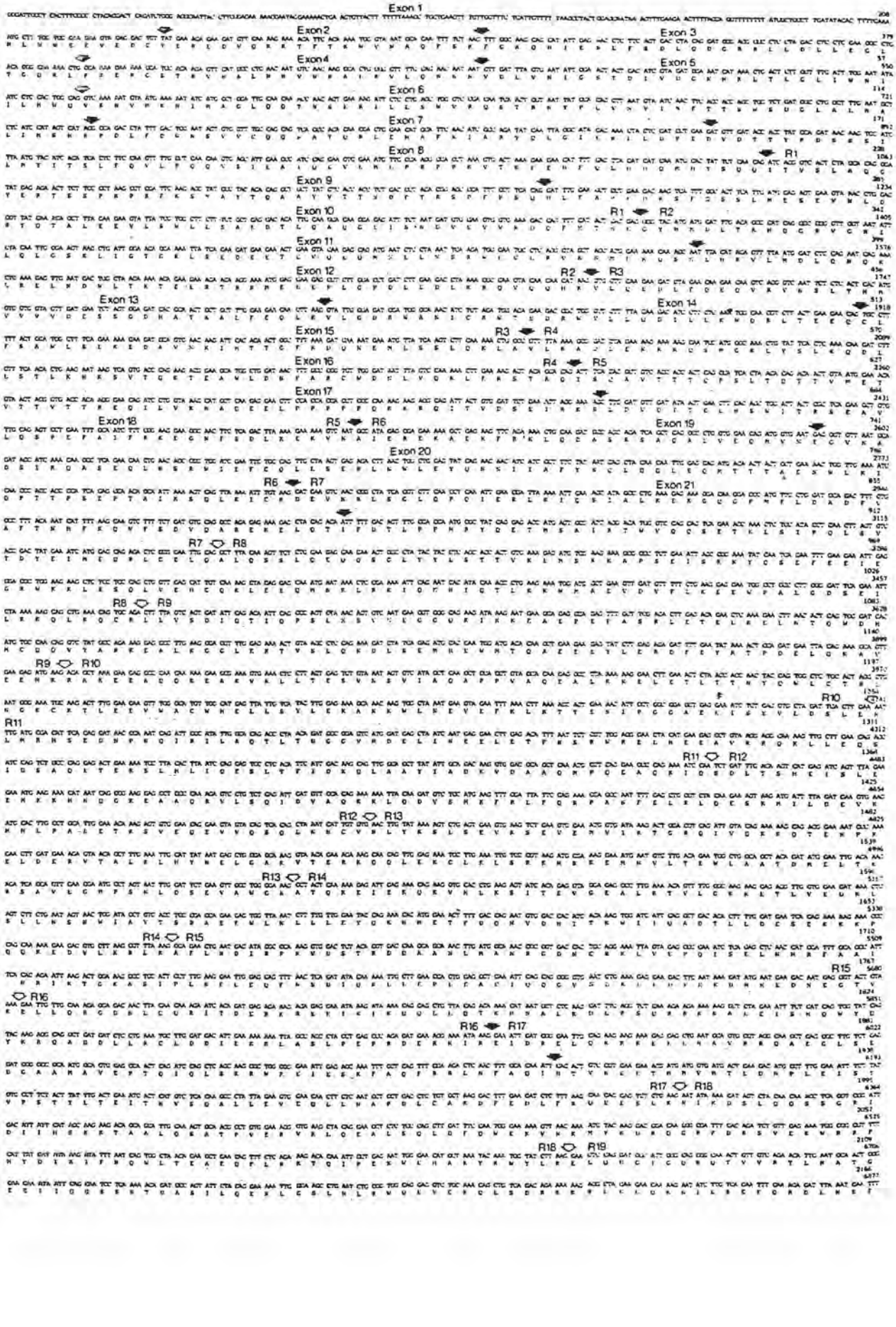
ผลทางพยาธิสภาพ พบสายใยกล้ามเนื้อเสื่อมแบบไม่มีลักษณะเฉพาะ บ่งไม่ได้ว่าเป็นโรคใด และเซลล์ที่ตายมีแผ่กระจายอยู่ทั่วไปในมัดกล้ามเนื้อ แต่ไม่รุนแรงเท่าใน DMD (Thomas et al.,1972; Rowland et al.,1979; Hopkins et al., 1981)

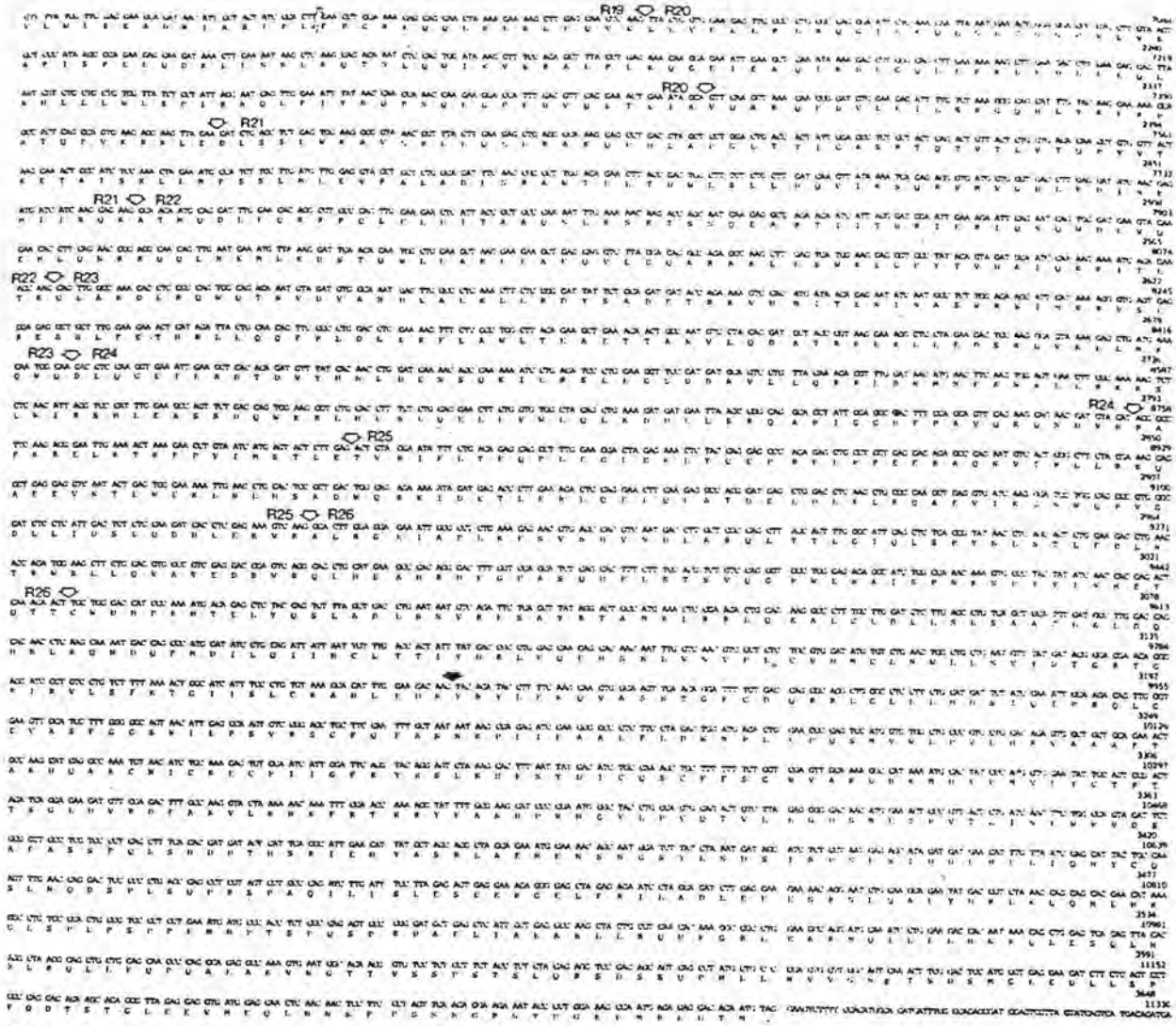
<u>การศึกษาโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์</u>

ความรู้พื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล และชีวเคมีของโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์ ยังไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายจนกระทั่งเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์ (Cytogenetic) พบตำแหน่งยีนที่ควบคุมโรค DMD/BMD นี้ (Verellen-Dumoulin และคณะ , 1984 ; Francke และคณะ ,1985) และเริ่มแยกยีนออกมาจากผู้ป่วยที่เป็นโรค DMD/BMD (Burghes และคณะ, 1987 ; Monaco และคณะ, 1988 ; Koenig และคณะ, 1988)

Koenig และคณะ (1988) ศึกษาจนได้ลำดับเบสของยีนดิสโทรฟินในส่วนที่ถอดรหัสสร้างโปรตีนส่วนที่เป็นโครงสร้างของเซลล์รูปแท่ง จากการใช้ โคลน (clone) จำนวน 22 โคลน ที่ต่างกัน แต่มีส่วนที่คาบเกี่ยวกันอยู่ พบว่ามีขนาด 14 กิโลเบส (Kb) และมีลำดับเบสดังภาพที่ 3

เนื่องจากยีนดิสโทรฟินมีขนาดใหญ่มาก จะถอดรหัสจากยีนแล้วสร้างโปรตีนขึ้นมาได้ขนาด 427 กิโลดาลตัน (Kd) การเกิดมิวเตชันส่วนใหญ่จะเป็นแบบการขาดหายไปภายในยีน (intragenic deletions) ประมาณ 65% หรือ เพิ่มขึ้นมา (duplication)


Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 4
Exon 5
Exon 6
Exon 7
Exon 8
Exon 9
Exon 10
Exon 11
Exon 12
Exon 13
Exon 14
Exon 15
Exon 16
Exon 17
Exon 18
Exon 19
Exon 20
Exon 21
R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19



ภาพที่ 3 แสดงลำดับเบส (14 กิโลเบส) ของยีนดิสโทรฟินที่ Koenig ทำการศึกษา ขอบเขต Exon ที่รู้จะกำหนดด้วยลูกศรสีดำ และช่วงที่คาดว่าเป็น repeat จะกำหนดด้วยลูกศรสีขาว ลำดับเบสช่วงที่แสดงขอบเขตของ exon จะมีหมายเลข exon กำกับไว้ตรงกลางลำดับเบส (Exon #) และช่วงที่เป็น repeats จะมีตัวเลขกำกับไว้ตรงบริเวณจุด เริ่มต้น และ จุดปลายของลำดับ เบส (R#) (Koenig และคณะ,1988)

ประมาณ 5% โดยการใช้เทคนิก เซาเทิร์น บล็อท (Koenig และคณะ , 1987 ; Forrest และคณะ,1988 ; Hu และคณะ , 1988)

จากการศึกษาของ Koenig, Forrest และ Hu ตรวจการขาดหายไปของยีนและการเพิ่มขึ้นมาของยีน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี เซาเทิร์น บล็อท ที่ใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ หรือ โพรบ (probe) กับยีนดิสโทรฟินบางช่วงที่แตกต่างกัน จำนวน 7 ช่วง นำโพรบที่แตกต่างกัน 7 แบบนี้ ไปศึกษาจากดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ร่างกาย (genomic DNA) พบว่าบริเวณที่มีการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟิน มักอยู่ใน 2 บริเวณ คือ บริเวณรอบเอกซอนที่ 44-53 และบริเวณปลาย 5' (5' terminus) (Koenig et al ., 1987 ; Forrest et al ., 1988 ; Hu et al ., 1988)

Koenig (1989) ได้รายงานว่าบริเวณที่มักมีการขาดหายไปของยีน จะมี 273 deletion map ดังภาพประกอบที่ 3 แสดงลำดับเบสของยีนดิสโทรฟินในช่วงที่ Koenig ศึกษา

Chamberlain และคณะ (1990) ได้รวบรวมข้อมูลบริเวณที่มักมีการขาดหายไปของยีน จากการรายงานของ Koenig (1989) ประกอบกับข้อมูลการออกแบบดีเอ็นเอเริ่มต้นของ Chamberlain (1988) ทำให้เขาออกแบบดีเอ็นเอเริ่มต้น ที่ใช้ในการตรวจการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟิน โดยเทคนิกการใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น หลายชุดในปฏิกริยาเดียวกัน เรียกว่า มัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ (Multiplex PCR) ตรวจสอบบริเวณ 6 เอกซอน (exons) พบว่า บริเวณที่มักพบการขาดหายไปของยีนในผู้ป่วย DMD/BMD ได้แก่ บริเวณเอกซอน 8, 17, 19, 44, 45, 48 วิธีการดังกล่าวใช้เวลาในการทำสั้นเพียง 1-2 วัน และใช้ genomic DNA จำนวนน้อยมาก การตรวจโรคโดยวิธีนี้สามารถตรวจพบการขาดหายไปของยีนได้ร้อยละ 80 ของคนไข้ทั้งหมดที่มีการขาดหายไปของยีน

Beggs และคณะ (1990) รายงานการทำ มัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ ที่เพิ่มความไว ในการตรวจสอบโดยการใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวน 10 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจการขาดหายไปของยีนบริเวณเอกซอนที่ 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60 และ promoter ซึ่งจะตรวจพบการขาดหายไปของยีนได้มากกว่า 97% เนื่องจากส่วนใหญ่เอกซอนเหล่านี้อยู่ใน hot spot region (exon 44-53) และ บริเวณ 5'terminus และมีวิธีการที่สะดวกในการอ่านผล สามารถตรวจได้ในเจลแผ่นเดียวกัน รายงานนี้ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในผู้ป่วยไทยในครั้งนี้

การแยกโครโมโซมดีเอ็นเอสายยาว

เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั่วไปประกอบด้วยโครโมโซม ซึ่งมีดีเอ็นเอ และโปรตีนรวมกันอย่างซับซ้อน ทำหน้าที่ในการสร้าง สังเคราะห์โปรตีน เอ็นไซม์ และควบคุมการแบ่งเซลล์เป็นต้น ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ โครโมโซมจะไม่ซับซ้อนมากนัก มีดีเอ็นเอ และโปรตีนแยกจากกัน ส่วนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโครโมโซมจะซับซ้อนมาก เนื่องจากดีเอ็นเอจะประกอบอยู่กับโปรตีนหลายชนิดม้วนตัวเป็นกลุ่มก้อน ดังนั้นในการที่จะแยกสกัดดีเอ็นเอสายยาวจากโครโมโซม จึงค่อนข้างยุ่งยากขึ้น

การแยกสกัด genomic DNA ซึ่งเป็นโครโมโซมดีเอ็นเอสายยาว โดยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ออกด้วย SDS (sodium dodecsyl sulfate) ซึ่งเป็นสารพวกดีเทอร์เจน และเอ็นไซม์ ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น proteinase K แล้ว ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ จะแยกออกมาอยู่ในสารละลาย พร้อมทั้งโปรตีน และเอ็นไซม์ที่ปะปนออกมาด้วย ซึ่งดีเอ็นเอสกัดแยกออกจากโปรตีนโดยใช้ฟีนอล (phenol) โดยส่วนโปรตีนละลายในชั้นของฟีนอล และบางส่วนจะตกตะกอนอยู่ระหว่างชั้น ส่วนดีเอ็นเอไม่ละลายในฟีนอล จะถูกแยกชั้นออกมาและเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายยาวที่ดีมีคุณภาพ การสกัดทุกขั้นตอนต้องทำอย่างเบา ๆ เพราะดีเอ็นเอสายยาวมีโอกาสขาดได้ง่าย ดีเอ็นเอสายยาวสามารถตกตะกอนได้ด้วยเอธานอล 100% ในสภาวะที่มีเกลือ เมื่อได้ตะกอนดีเอ็นเอแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเกลือออกด้วยเอธานอล 70% ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้ว ละลายด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ จากนั้นวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง (optical density : O.D.) ที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอที่คุณภาพต่าง ๆ จะมีอัตราส่วนของ O.D. $_{260}$: O.D. $_{280}$ ดังนี้คือ ถ้าค่าอัตราส่วนของ O.D. $_{260}$: O.D. $_{280}$ อยู่ระหว่าง 1.6-1.9 หมายถึง ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้าน้อยกว่า 1.6 หมายถึง มีโปรตีนปนเปื้อน ถ้ามากกว่า 1.9 หมายถึง มี RNA ปนเปื้อน

การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการคำนวนจากค่า O.D. $_{260}$ ตามสมการ 1 O.D. $_{260}$ nm/ml = DNA 50 μg/ml

ปฏิกริยาพอลิเมอเรสเชน (Polymerase Chain Reaction)

Saiki และคณะ (1985) Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติ ที่เกิดขึ้นเมื่อจะมีการแบ่งเซลล์ โดยที่พีซีอาร์ เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลอง และสามารถกำหนดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการได้ และสามารถสังเคราะห์ให้ได้ปริมาณมากเท่าที่ต้องการ การค้นพบเทคนิคนี้ทำให้ห้องปฏิบัติการทางเคมี หรือชีวเคมีใด ๆ ก็ตามที่มีอุปกรณ์พอสมควรจะสามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ นอกจากนี้เทคนิคพีซีอาร์ ยังเป็นเทคนิคที่ง่าย สามารถเรียนรู้ได้ภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ผลภายในเวลาสองสามชั่วโมง อีกทั้งไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ หรือเครื่องมือทันสมัยที่มีราคาแพง แต่ในปัจจุบันได้มีเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับการทำพีซีอาร์ออกจำหน่าย เพื่อลดการกระทำซ้ำ ๆ ในกระบวนการทดลอง

Kary Mullis แห่งบริษัทซีตัส (Cetus Corporation) ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นผู้คิดค้นเทคนิค พีซีอาร์ขึ้นมาได้ใน ปี 1983 (Mullis K .B., 1990)

Saiki และคณะ (1985) แห่งบริษัทซีตัส (Cetus Corporation) ได้เสนอผลงานการค้นพบ ปฏิกริยาพีซีอาร์ ในการประชุม A merican Society of Human Genetics Conference ภายใต้ชื่อเรื่องว่า Novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia

ต่อมานักวิจัยกลุ่มเดียวกัน คือ Randall Saiki และ Henry Erlich ได้เสนอเทคนิคนี้เป็นครั้งแรกในวารสาร Science ปี 1985 (Saiki RK.,et.al., 1985)

หลังจากนั้น ได้มีผู้สนใจนำเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งสามารถพัฒนาเทคนิคทำให้วิธีการเป็นแบบอัตโนมัติได้ การใช้เทคนิคนี้จึงมีที่เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว

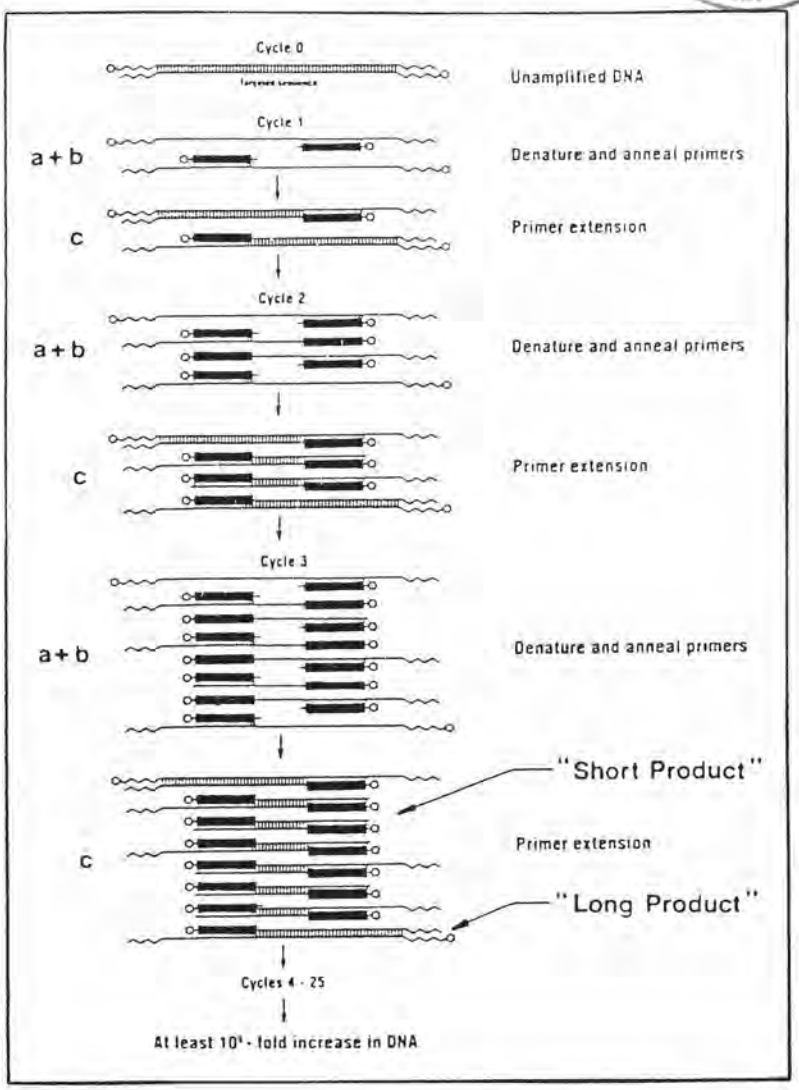
พีซีอาร์อาศัยหลักการของการเกิด DNA replication โดยทำให้เกิดในหลอดทดลอง แบบซ้ำ ๆ กันหลายรอบ (repeated cycles) โดยอาศัยดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ขนาดสั้น ๆ โดยทั่วไปจะมีความยาวประมาณ 20-30 เบส และถูกสร้างขึ้นมา เพื่อให้มีลำดับของเบสที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวคนละสาย ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาโดย ดีเอ็นเอเริ่มต้นจะมีทิศทางตรงข้าม ดังรูปที่ 4

พีซีอาร์ มี 3 ขั้นตอนได้แก่

1. denaturation ทำให้ดีเอ็นเอตั้งต้นสายคู่ แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 ^{0} C

2. primer annealing ดีเอ็นเอเริ่มต้น 2 สาย เข้าไปจับคู่สมบนดีเอ็นเอตั้งต้น ที่เป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 ^{0} C

3. primer extention หรือ elongation การต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'- OH ของดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยใช้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) และ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate) ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) เป็นซับเสตรท



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนพื้นฐานของปฏิกริยาพอลิเมอเรสเชน ที่มีเอ็นไซม์ DNA polymerase ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า ในทุก ๆ รอบของปฏิกริยา ซึ่งจะมี 3 ขั้นตอนในแต่ละรอบได้แก่ 1) Denature ทำให้สายดีเอ็นเอตั้งต้นแยกออกเป็นสายเดี่ยว 2) Primer annealing มีช่วงอุณหภูมิเหมาะสมให้สาย primer แต่ละสายเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตั้งต้นที่เป็นคู่สมกัน และ 3) Primer extention เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเอ็นไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของ primer (Saiki และคณะ, 1985)

เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเดิมได้อย่างมากมาย

ยีนดิสโทรฟิน และมัลติเพลกซ์ พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

Chamberlain และคณะ (1988) เป็นบุคคลกลุ่มแรกที่รายงานการใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการตรวจหาความผิดปกติแบบการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟิน โดยสามารถขยายดีเอ็นเอ 9 ตำแหน่งบนยีนดิสโทรฟินได้พร้อมกันในปฏิกริยาพีซีอาร์เดียว

ความผิดปกติแบบการขาดหายไปของยีนนี้ มักจะมีการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่พอสมควร ไปจนถึงใหญ่มาก หรือบางครั้งอาจขาดหายไปทั้งยีนโดยไม่ทราบตำแหน่งการขาดที่แน่นอน เทคนิคพีซีอาร์ ที่พัฒนาขึ้นเพื่อช่วยการวินิจฉัยความผิดปกติแบบนี้ ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ มัลติเพลกซ์ พีซีอาร์ (Multiplex PCR) หลักการคือ การใช้พีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของทุกเอกซอน (exon) ของยีนขึ้นพร้อมกันด้วยไพรเมอร์ผสมในปฏิกริยาเดียวกัน และติดตามวิเคราะห์ดูผลผลิตพีซีอาร์ ภายใต้วุ้นเมื่อเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้า แล้วสังเกตดูขนาดของแถบผลผลิตดีเอ็นเอ เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide วิธีนี้จะช่วยตรวจหาส่วนของยีนทุกๆส่วนพร้อมกัน หากเอกซอนใดมีขนาดเล็กและอยู่ติดกัน ก็สามารถเพิ่มขยายจำนวนให้เป็นชิ้นเดียวกันได้ และเป็นการประหยัดการใช้ไพรเมอร์ด้วย การตรวจหาการขาดหายไปของยีนที่มีขนาดใหญ่พอสมควรนี้ทำได้ง่าย และเห็นได้ชัดเจนจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ ข้อสำคัญของการใช้เทคนิคนี้ คือ การออกแบบไพรเมอร์ให้มี melting temperature ใกล้เคียงกันเพื่อที่จะทำงานในสภาวะ annealing ได้ทุกคู่ primers แต่ละคู่ต้องออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกัน และให้ผลิตผลจากปฏิกริยาพีซีอาร์มี ขนาดความยาวแตกต่างกัน