บทนำ

ความผิดปกติของกระจกตา ส่วนหนึ่งเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม การทราบสาเหตุและกลไกที่นำไปสู่ความผิดปกติ ทำให้การดูแลรักษามีประสิทธิภาพ ลดความทุพพลภาพที่เกิดจากการสูญเสียการมองเห็น ซึ่งมีผลกระทบต่อผู้ป่วย ครอบครัวและสังคมอย่างยิ่ง การที่สามารถให้การวินิจฉัยความผิดปกติได้อย่างถูกต้อง ประกอบกับการใช้ความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์ สามารถที่จะค้นหาสมาชิกครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค นำไปสู่การป้องกัน และการให้คำปรึกษาการพันธุกรรมได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

การศึกษาวิจัยความผิดปกติของกระจกตาที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ได้นำไปสู่การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมากขึ้นเรื่อยๆ ความผิดปกติของกระจกตาชนิด epithelial corneal dystrophies ลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และยีนที่เกี่ยวข้องสรุปได้ดังในตารางที่ 1[1]

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มอาการความผิดปกติของกระจกตา การถ่ายทอดทางพันธุกรรม และช่วงที่เริ่มมีอาการ

	CHED1	CHED2	PPCD1	PPCD2	PPCD3	FECD1	FECD2
การถ่ายทอด	dominant	recessive	dominant	dominant	dominant	dominant	dominant
ยีนที่เกี่ยวข้อง	unknown	*SLC4A11*	*VSX1*	*COL8A2*	*TCF8*	*COL8A2*	unknown
ช่วงที่เริ่มมีอาการ	early	birth	early	early	early	early	late

กลุ่มอาการ congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) เชื่อว่าเกิดจากการเสื่อม (degeneration) หรือ การเจริญได้น้อย (hypoplasia) ของกลุ่มเซลล์ endothelium[2] การถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นได้ทั้งลักษณะเด่น (CHED1) และลักษณะด้อย (CHED2) ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบในชิ้นส่วนของกระจกตาที่ผิดปกติ ประกอบด้วย การบวม (edema) ทั้งส่วนของ epithelium และ stroma ความผิดปกติในส่วนของ Bowman membrane เซลล์ corneal epithelium จะเปลี่ยนเป็นลักษณะมีหลายนิวเคลียส (multinucleated) และส่วนของ Descemet's membrane จะหนาขึ้น[3]

โรค CHED ชนิดที่ 1 (CHED1) ที่ถ่ายทอดในลักษณะเด่นและ CHED ชนิดที่ 2 (CHED2) ที่ถ่ายทอดในลักษณะด้อย มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางคลินิกและสาเหตุทางพันธุกรรม[4] ผู้ป่วยที่เป็นโรค CHED2 จะเริ่มมีอาการตั้งแต่แรกเกิดหรือในช่วงเดือนแรก (neonatal period) ในขณะที่ ผู้ป่วยที่เป็นโรค CHED1 มักจะเริ่มมีอาการในช่วงวัยเด็ก (childhood) อาการที่พบในผู้ป่วย CHED2 โดยทั่วไปจะมีอาการรุนแรงกว่าที่พบในผู้ป่วยที่เป็นโรค CHED1 อาการที่พบ ประกอบด้วย แก้วตาขุ่น (cloudy cornea) ตามัว (blurred vision) และอาจจะมีตากระตุก (nystagmus) ได้ในผู้ป่วยบางราย[2]

การศึกษาในครอบครัวที่มีสมาชิกหลายคนเป็นโรค CHED สามารถค้นหาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED2 ได้ที่ตำแหน่งโครโมโซม 20p13[5] ซึ่งแตกต่างจากตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED1 ซึ่งอยู่ที่ 20p11.2-q11.2 บริเวณ pericentromere[6] จากการค้นพบดังกล่าวนำไปสู่การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED โดยยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ bicarbonate transporters เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED2 ยีนดังกล่าวมีชื่อว่า sodium bicarbonate transporter-like solute carrier family 4 member 11 (*SLC4A11*)[7] ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เป็น bicarbonate transporter สำคัญ SLC4A11

เป็น electrogenic Na/borate cotransporter ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเพิ่ม borate ในเซลล์ และเพิ่มการทำงานของ MAPK pathway[8] สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED1 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

การศึกษาที่ผ่านมา พบการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A11* ในครอบครัวที่มีผู้ป่วยเป็นโรค CHED2 ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบ ประกอบด้วย การกลายพันธุ์ชนิด nonsense, missense และ frameshift ทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีขนาดสั้นลง ไม่สามารถทำงานได้ (loss of function)[7, 9-17] การที่เซลล์ขาดโปรตีน SLC4A11 ส่งผลให้การขนส่ง sodium และ bicarbonate ผิดปกติ ทำให้เกิดการบวมของเซลล์ corneal epithelium นอกจากนี้ ยังมีผลกระทบต่อการแบ่งตัวของเซลล์ เนื่องจาก SLC4A11 ทำหน้าที่เป็น borate transporter ด้วย

นอกจากความผิดปกติของกระจกตาที่เกิดจาก epithelial corneal dystrophies ยังมีโรคพันธุกรรมทางเมแทบอลิกที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติของกระจกตาร่วมด้วย โรคที่มีความสำคัญและถ่ายทอดทางพันธุกรรมในลักษณะด้อย คือ กลุ่มอาการ mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 (MPS I) เป็นความผิดปกติที่มีการสะสมของสารในไลโซโซม (lysosomal storage) MPS I เกิดจากความบกพร่องของการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แอล-ไอดูโรนิเดส (□-L-iduronidase, IDUA) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในส่วนของ □-L-iduronide glycosidic bond ที่อยู่ส่วนปลายของสาร glycosaminoglycans (GAGs) dermatan และ heparan sulphates การขาดเอนไซม์หรือการที่เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง ทำให้เกิดการสะสมของสารไกลโคซามิโนไกลแคนที่ไม่ถูกย่อยสลายหรือสลายได้เพียงบางส่วนในไลโซโซมของเนื้อเยื่อต่างๆนำไปสู่อาการและอาการแสดงที่พบในโรค MPSI[18] ลักษณะอาการที่พบใน MPS I แบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามความรุนแรงที่พบและอายุที่เริ่มมีอาการ ได้แก่ Hurler, Hurler/Scheie, และ Scheie กลุ่มอาการ Hurler เป็นชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด ประกอบด้วย ตับและม้ามโต กระดูกผิดปกติ พัฒนาการช้า และแก้วตาขุ่น ซึ่งพบมีอาการในขวบปีแรก ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตก่อนอายุ 10 ปี จากภาวะหายใจอุดตัน การติดเชื้อในทางเดินหายใจ และภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นกับหัวใจ สำหรับผู้ป่วยกลุ่มอาการ Scheie อาการจะรุนแรงน้อยกว่าและเริ่มเมื่ออายุมากกว่า ผู้ป่วยมีแก้วตาขุ่น กระดูกผิดปกติโดยเฉพาะมือ ทำให้มีข้อติด (stiff joints) ตับและม้ามโตไม่มาก การพัฒนาการและสติปัญญามักจะปกติ สำหรับผู้ป่วยกลุ่มอาการ Hurler/Scheie จะมีอาการรุนแรงอยู่ในระหว่างสองชนิดที่กล่าวมาข้างต้น อาการมักจะเริ่มในช่วงเด็กโตหรือช่วงเข้าวัยรุ่น จะมีความผิดปกติของอวัยวะเช่นเดียวกับผู้ป่วยกลุ่มอาการ Hurler แต่การพัฒนาการหรือสติปัญญาค่อนข้างดี[18]

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมา สามารถค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ α-L-iduronidase (*IDUA*) อยู่บนโครโมโซม 4p16.3[19, 20] ประกอบด้วย 14 exons สร้าง mRNA ที่มีขนาด 2.3 kb และโปรตีนเริ่มต้นที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 653 ตัว[20, 21]

ในปัจจุบัน การวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีลักษณะอาการทางคลินิกเข้าได้กับ MPS I อย่างแน่นอนสามารถกระทำได้โดยการวัดปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ α-L-iduronidase ในเม็ดเลือดขาว (leucocytes) หรือเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสที่ได้จากผู้ป่วย (fibroblast cultures) อย่างไรก็ตาม การวัดการทำงานของเอนไซม์ไม่สามารถนำมาใช้ค้นหาผู้ที่เป็นพาหะของโรค และช่วยในการวินิจฉัยก่อนคลอดได้

การทดสอบและวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *IDUA* ในครอบครัวที่มีผู้ป่วยเป็นโรค MPS I ได้นำไปสู่ความเข้าใจและพบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์และลักษณะที่พบในผู้ป่วยได้ในระดับหนึ่ง (genotype/phenotype correlation) ผู้ป่วยกลุ่มอาการ Hurler จะมีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *IDUA* ที่ทำให้

ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำงานได้ ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มอาการ Scheie จะมีการกลายพันธุ์ที่ยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ยังพอทำงานได้บ้าง (residual enzyme activity) นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การกลายพันธุ์ที่เป็น non-pathogenic polymorphisms มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน[21] ดังนั้น การทดสอบและวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยโรค MPS I ในประชากรต่างๆ สามารถนำไปสู่การเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่าง genotype และ phenotype ที่เพิ่มขึ้น และการค้นพบลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการรักษาสำหรับผู้ป่วยได้ในอนาคต รวมทั้งการค้นหาผู้ที่เป็นพาหะของโรค และการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

โรค cystinosis เป็นโรคพันธุกรรมอีกโรคหนึ่งที่ถ่ายทอดในลักษณะด้อยซึ่งเกิดจากการสะสมของสารในไลโซโซม เนื่องมาจากความบกพร่องในการขนย้ายของ cystine ออกจากไลโซโซม ทำให้มีผลกระทบต่อหลายอวัยวะ ได้แก่ ตา และไต เป็นต้น[22].การกลายพันธุ์ในยีน *CTNS* เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค cystinosis[23] ยีน *CTNS* ประกอบด้วย 12 exons สร้างโปรตีน cystinosin ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 367 ตัว เป็นโปรตีนอยู่ที่ membrane ของไลโซโซม

การศึกษานี้เป็นการรวบรวมผู้ป่วยไทยที่มีอาการและอาการแสดงที่เข้าได้กับโรค ได้แก่ กลุ่มอาการ congenital hereditary endothelial dystrophy, mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 และ cystinosis ซึ่งผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์ด้วยเรื่องความผิดปกติของกระจกตาร่วมด้วย การศึกษาหาการกลายพันธุ์ของยีน นำไปสู่การยืนยันการวินิจฉัยโรค การรักษาที่ถูกต้องเหมาะสมและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมแก่ครอบครัว เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วยและครอบครัว นอกจากนี้ การศึกษาเพิ่มเติมถึงการทำงานของยีนที่เกิดจากการการกลายพันธุ์ ช่วยให้เกิดความเข้าใจเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับการทำงานของยีน ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ที่พบและการแสดงออกของโรค นำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกการเกิดโรค ซึ่งความรู้เหล่านี้อาจจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการรักษาโรคต่อไปในอนาคตได้

วิธีการทดลอง

1. กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม

   กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 ซึ่งมารับการดูแลรักษาที่แผนกจักษุ และแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งขณะนี้ มีครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 อย่างน้อย 1 ครอบครัว และครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรค mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 อย่างน้อย 2 ครอบครัว การศึกษานี้ จะครอบคลุมผู้ป่วยทุกรายที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค ถ้าพบผู้ป่วยมากขึ้นระหว่างการศึกษา ทางกลุ่มวิจัยก็จะรับผู้ป่วยเข้าศึกษาในโครงการถ้าผู้ป่วยและครอบครัวยินยอม การศึกษานี้จะศึกษาลักษณะทางคลินิกและการกลายพันธุ์ของยีนในสมาชิกครอบครัวอย่างน้อย 2 รุ่น

แต่ละครอบครัวจะได้รับการวิเคราะห์พงศาวลี เพื่อหาสมาชิกครอบครัวที่เป็นโรค สมาชิกที่เป็นพาหะหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค

กลุ่มควบคุม คือ ผู้ที่ไม่เป็นโรคดังกล่าวและไม่มีประวัติสมาชิกอื่นๆในครอบครัวเป็นโรค ในกรณีที่พบมีการกลายพันธุ์ใหม่ของยีนดังกล่าวในผู้ป่วย จะมีการนำสารพันธุกรรม DNA จากกลุ่มควบคุมจำนวน 100 คน มาตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเฉพาะตรงบริเวณที่พบการกลายพันธุ์ เป็นการยืนยันว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวสำคัญต่อการเกิดโรค

2. การยินยอมเข้าร่วมโครงการ

   ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยได้รับจากผู้ป่วยหรือผู้ปกครองและโครงการได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเก็บตัวอย่างเลือด

   เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เข้าร่วมการวิจัยใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) เพื่อสกัดสารพันธุกรรม

4. การสกัดสารพันธุกรรม (RNA และ DNA)

   สารพันธุกรรม RNA และ genomic DNA จะถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยวิธีมาตรฐานโดยใช้ Qiagen RNA and DNA extraction kits (Qiagen, Valencia, CA)

5. การทำ genotyping โดยใช้ markers ในบริเวณโครโมโซม 20p ซึ่งอยู่ในบริเวณตำแหน่งของยีน *SLC4A11*

   เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าการถ่ายทอดของยีนที่ผิดปกติไปได้กับ markers ที่อยู่ใกล้หรือในยีน *SLC4A11* ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่า โรค congenital hereditary endothelial dystrophy ที่พบในสมาชิกครอบครัวน่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A11* การทำ genotyping จะใช้ microsatellite markers ที่เคยได้รับการศึกษามาก่อนหน้านี้ (ABI linkage mapping set, Foster City, CA)[16]

6. การเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนที่ต้องการโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

   สำหรับการเพิ่มปริมาณของส่วนของยีน *SLC4A11* ที่สร้างโปรตีน โดยวิธี PCR โดยใช้ primers ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง primers และ condition สำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ exon ต่างๆ ของยีน *SLC4A11*

Exon	Primer Sequences for PCR 5' to 3'		Annealing Temperature (^{0}C)
	Forward	Reverse	
1	CTAGGGTGGCGTGGGTTG	AGCACTAGAGTGGCCCAGAT	60
2-3	GATGGCCTCTCCCACCAC	CTCCCTGTTGAGCTGCTCCT	60
4-5	TCCAGGAGCAGCTCAACAG	TCTTCTCCCAAGTTGGTTGG	60
6	CAAGGTCGAGGGGGTTCT	GTTTCTGACACACCCACAGG	60
7-8	AGCCTGGGTGACAGTGAGAC	ACAGCCTTGTTTTTCCCAAT	60
9-10	ACTGATGGTACGTGGCCTCT	CGTCCATGCGTAGAAGGAGT	60
11-12	CATTGGTGATTCTGCTGACC	ACTCAGCTTGAGCCAGTCCT	60
13-14	GAGCCCTTTCTCCCTGAGAT	GGTTGTAGCGGAACTTGCTC	60
A15	GCCTTCTCCCTCATCAGCTC	GTAGGCAGTGCCCTTCACC	60
16	AATGCACCGGAGAACAGGT	CCGCGAGTGTCACCTCTG	60
17	CGTGGACCCTGAGGAGTG	CCCTCCGGATGTAGTGTGTC	60
18	CTCGATGGCAACCAGCTC	CTAGGCAGGACCCCTCCTC	66

19	CAGGAGGGGCTCCAGTCTA	ACAGAGCAGTCACCCACACA	66

สำหรับการเพิ่มปริมาณของส่วนของยีน *IDUA* ที่สร้างโปรตีน โดยวิธี PCR ใช้ primers ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง primers และ condition สำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ exon ต่างๆ ของยีน *IDUA*

Exon	Primer Sequences for PCR 5' to 3'		Annealing Temperature (^{0}C)
	Forward	Reverse	
1	ACCCAACCCCTCCCAC	AGCTTCAGAGACCGGAGC	58
2	GAACGTGTGTGTCAGCCG	GCTCGGAAGACCCCTTGT	62
3-4	TTCCAGCCTGGAGCATGGAG	GTTGCACCCCTATCACGCAG	62
5-6	TCACCTTGCACCCTCCCTCC	GCTGACCCTGGTGGTGCTGA	62
7	TGCGGCTGGACTACATCTC	GCAGCATCAGAACCTGCTACT	62
8	CCACCTTCCTCCCGAGAC	GGAGCGCACTTCCTCCAG	62
9-10	TCCTTCACCAAGGGGAGG	TCCTCAGGGTTCTCCAGG	58
11-12	GTGTGGGTGGGAGGTGGA	CTTCACCCATGCGGTCAC	62
13-14	CTGCCTGCTCCCACCTTTGA	CCCATGCTGCCCTCCCATCA	62

7. DNA sequencing ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำไปหาลำดับเบส

ผลผลิตจาก PCR จะได้ถูกนำไปหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc., Seoul, Korea

8. การวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ (mutation analysis)

ข้อมูลลำดับเบสจะได้รับการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Sequencher (version 4.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI)

9. การแยกเม็ดเลือดขาว

เม็ดเลือดขาวจะได้รับการสกัดแยกออกมาจากเลือดที่ได้โดยใช้วิธี dextran extraction เพื่อนำเม็ดเลือดขาวไปใช้ในขั้นตอนการวัดการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

10. การวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากเซลล์ (cell lysates)

วัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (Bradford protein assay)

11. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในยีน *IDUA* ที่พบในผู้ป่วย MPS I

11.1 การสร้าง expression constructs ที่ประกอบด้วย mutant *IDUA* cDNA โดยวิธี site-directed mutagenesis

Wild-type *IDUA* cDNA ที่ได้รับการใส่ (clone) เข้าไปในระหว่าง *Eco*RI restriction sites ของพลาสมิด (plasmid) pEFNeo (pEFNeo/wtIDUA) ซึ่งได้รับมาจาก Professor John Hopwood, Professor Hopwood เป็นนักวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับยีนดังกล่าวและมีผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารชั้นนำ

pEFNeo/wtIDUA ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสร้าง cDNA ที่มีการเปลี่ยนเบส (*in vitro* mutagenesis) ดังนั้น การสร้าง plasmids ที่ประกอบด้วย IDUA cDNA ที่มีการกลายพันธุ์ซึ่งพบในผู้ป่วย (mutant IDUA cDNA หรือ pEFNeo/mutant IDUA) ทำโดยวิธี *in vitro* mutagenesis โดยใช้ pEFNeo/wtIDUA เป็น plasmid ต้นแบบ plasmid ที่ได้จากการทำ *in vitro* mutagenesis จะได้รับการทดสอบยืนยันว่าเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ต้องการโดย direct sequencing

11.2 Cell culture, transfection assay

เซลล์ที่นำมาใช้ คือ COS-7 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการนำมาใช้ในการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ IDUA แล้ว เซลล์ได้รับการเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium ที่มี 10 % fetal-calf serum และ ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เซลล์ได้รับการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 6 หลุม (six-well plates) โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย จำนวน 2×10^5 เซลล์ เซลล์ได้รับการเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีระดับความเข้มข้นของ CO2 ที่ร้อยละ 5 ก่อนที่จะได้รับการ transfection ภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับ plasmids ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ pEFNeo/wtIDUA และ pEFNeo/mutant IDUA

Plasmids ที่ต้องการทดสอบ ได้รับการใส่เข้าไปในเซลล์ (transfection) โดยใช้ Effectene (Qiagen) สำหรับปริมาณ plasmids ที่นำมาใช้ในการทำ transfection เป็นดังนี้ 0.8 μg/well หลังจาก transfection เซลล์ได้รับการเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีระดับความเข้มข้นของ CO2 ที่ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เซลล์ถูกทำให้สลายเพื่อแยกโปรตีน และนำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ IDUA ต่อไป

11.3 การศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ IDUA

วัดระดับการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีวัดค่าการเปล่งแสงของฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้ 4-methylumbelliferyl-alpha-L-iduronide (Glycosynth) เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา การทดลองของแต่ละ constructs ที่นำมาศึกษาจะทำเป็น triplicate

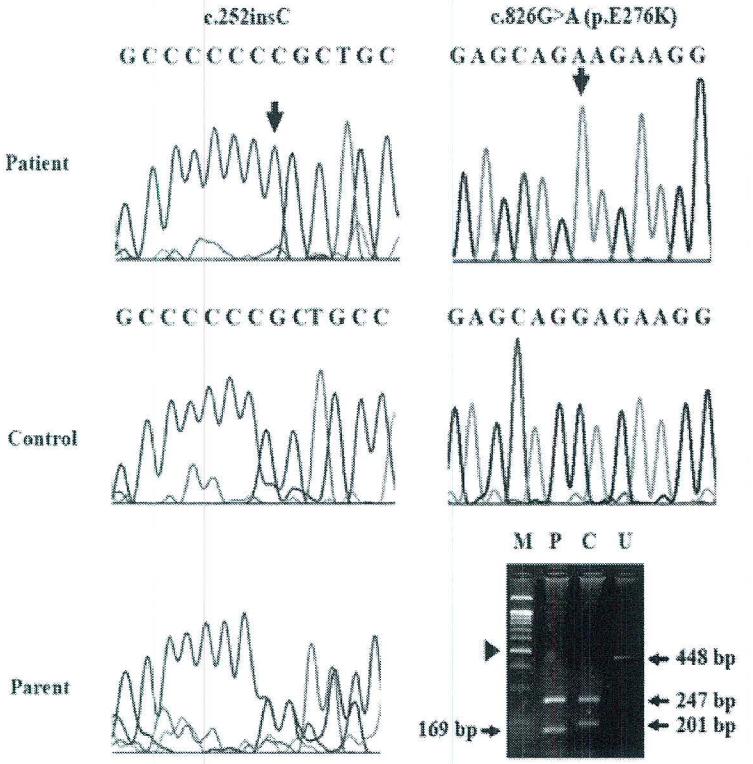
11.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลลำดับเบสได้รับการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Sequencher (version 4.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI)

ข้อมูลที่แสดงถึงระดับการทำงานของเอนไซม์ IDUA เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ค่าดังกล่าวได้รับการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผู้ป่วยโรค MPS I และคนที่ไม่เป็นโรค

ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในผู้ป่วยไทยกลุ่มอาการ mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 พบผู้ป่วยรายที่ 1 เป็นกลุ่มอาการ Hurler หรือ MPS IH ซึ่งมีอาการรุนแรงมากที่สุด และรายที่ 2 เป็นกลุ่มอาการ Scheie หรือ MPS IS ซึ่งมีอาการรุนแรงน้อยกว่า การยืนยันการวินิจฉัยโรคทำโดยการทดสอบทางเคมีและทางพันธุกรรม การตรวจหาการกลายพันธุ์พบว่าผู้ป่วย MPS IH มีการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ซึ่งเคยมีการรายงานมาก่อน ขณะที่ผู้ป่วย MPS IS มีการกลายพันธุ์ชนิด c.826G>A (p.E276K) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงาน (รูปที่ 1) เมื่อรวบรวมการศึกษาในผู้ป่วยไทยที่เป็น MPS IH การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC พบ 3 ใน 6 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 50 ของการกลายพันธุ์ที่พบ ซึ่งอาจจะบ่งบอกว่า การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในผู้ป่วยไทยที่เป็น MPS IH สำหรับการกลายพันธุใหม่ชนิด p.E276K ไม่พบในคนไทยที่ไม่เป็นโรคจำนวน 50 คน (100 control chromosomes) ผลการทดสอบการทำงานของยีนที่สร้างเอนไซม์ alpha-L-iduronidase ในเซลล์ COS-7 พบการทำงานที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับยีนที่สร้างเอนไซม์ได้ปกติ (ตารางที่ 3) ซึ่งสนับสนุนการกลายพันธุชนิด p.E276K เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ดังในบทความ (manuscript) เรื่อง “A novel *IDUA* mutation, c.826G>A, in a Thai patient with mucopolysaccharidosis type I” ที่แนบมา (ภาคผนวก)



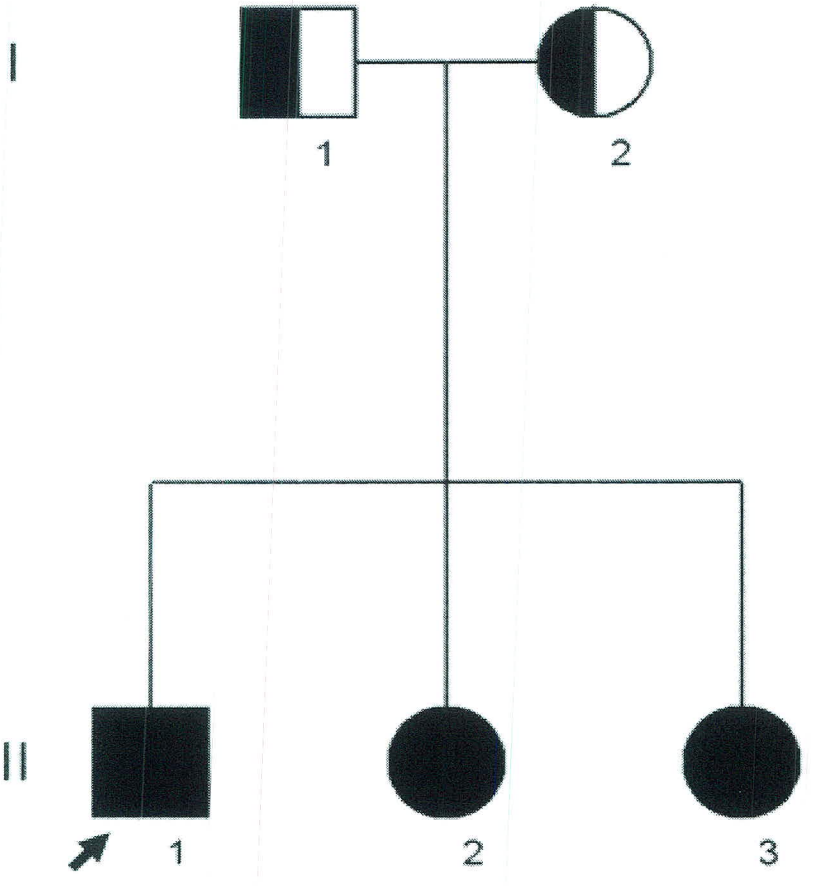
รูปที่ 1 การศึกษาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยกลุ่มอาการ mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 (ด้านซ้าย) การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC (ลูกศร) พบในผู้ป่วย MPS IH ซึ่งมีบิดาและมารดาเป็นพาหะ (ด้านขวา) การกลายพันธุ์ชนิดc.826G>A (p.E276K) (ลูกศร) พบในผู้ป่วย MPS IS

M=100-bp marker, P=patient, C=control, U=uncut amplified products หัวลูกศรชี้ขนาด 500 bp

ตารางที่ 3 α-L-iduronidase activity ในเซลล์ COS-7 ที่ได้รับการใส่ส่วนของ *IDUA* ที่ปกติหรือ *IDUA* ที่มีการกลายพันธุ์

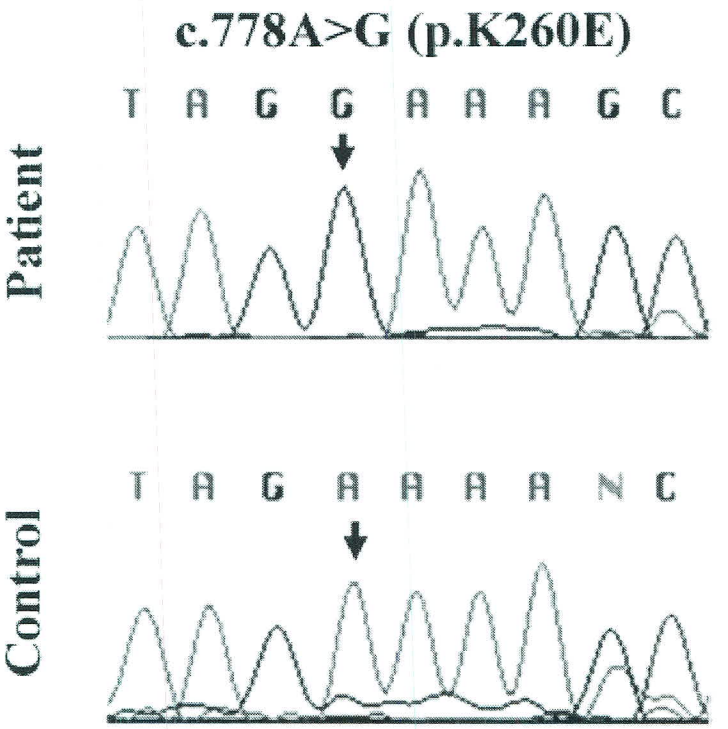
Constructs	α-L-iduronidase activity (nmol/h/mg cell protein) mean ± SD	Phenotype
None	27.17±4.89	-
pEFNeo	32.52±10.58	-
pEFNeo/IDUA	435.04±56.23	-
pEFNeo/p.W402X	21.10±12.57	Hurler
pEFNeo/p.E276K	31.88±6.05	Scheie

การศึกษาในผู้ป่วยโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 พบครอบครัวผู้ป่วยไทยที่มีบุตรทั้ง 3 คนมีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 บิดาและมารดาแข็งแรง ไม่ได้เป็นญาติกัน พงศาวลีของครอบครัวสรุปได้ดังรูปที่ 2



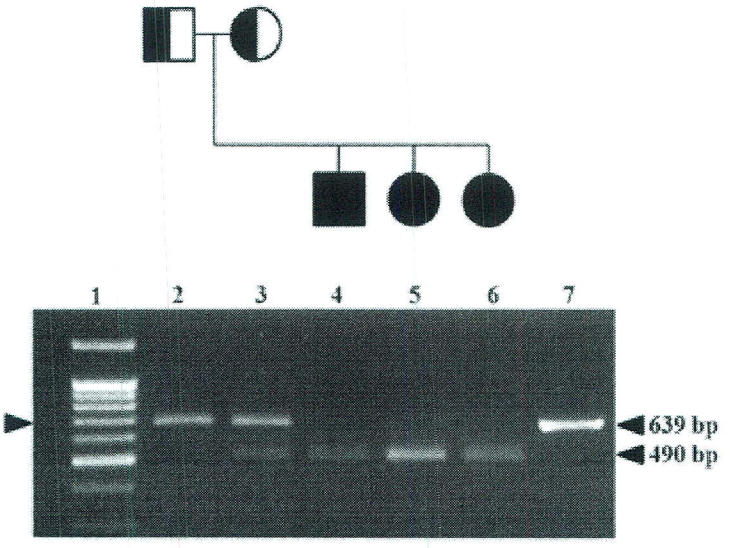
รูปที่ 2 แสดงพงศาวลีของครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2

ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี PCR-sequencing พบการกลายพันธุ์ชนิด missense ในยีน *SLC4A11* โดยมีการเปลี่ยนเบสนิวคลิโอไทด์จาก A เป็น G (c.778A>G) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 260 จากไลซีนเป็นกลูตามิก (p.K260E) ดังแสดงในรูปที่ 3



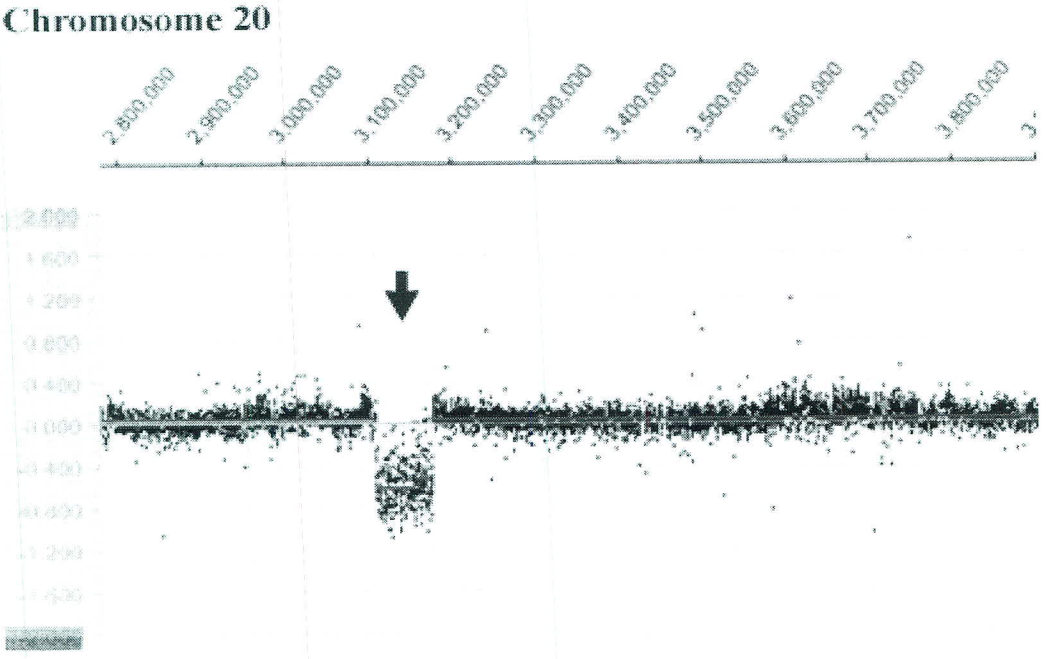
รูปที่ **3** แสดงการกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) ในยีน *SLC4A11* ซึ่งพบในผู้ป่วยโรค CHED2

การกลายพันธุ์ชนิดนี้ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จากการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A11* ในบิดาและมารดาของผู้ป่วย พบการกลายพันธุ์ชนิด missense ในมารดา แต่ไม่พบในบิดา ดังแสดงในรูปที่ 4 นอกจากนี้ ได้ทำการหาลำดับเบสในบริเวณ promoter ของยีน *SLC4A11* ผล PCR-sequencing ไม่พบการกลายพันธุ์



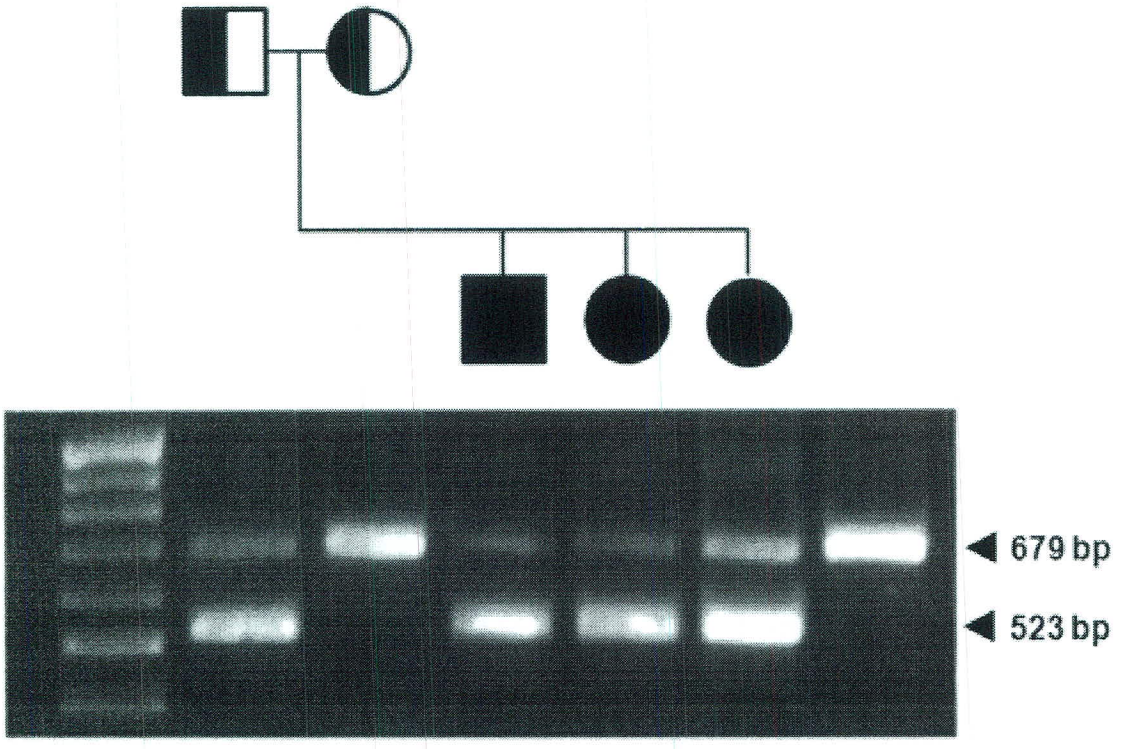
รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด missense พบว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวพบในผู้ป่วยและในมารดา

จากข้อมูลนี้ เป็นไปได้ว่า บิดามีการขาดหายไป (deletion) ของยีน *SLC4A11* ทำให้พบการกลายพันธุ์เป็นในลักษณะ hemizygous deletion ผลการตรวจหา deletion บนโครโมโซมที่ 20 ในผู้ป่วยโดยวิธี array CGH พบ deletion ตั้งแต่บริเวณ 3107501 ถึง 3174468 ซึ่งมีขนาดประมาณ 67 กิโลเบส ครอบคลุมบริเวณที่มียีน *SLC4A11* (ตำแหน่ง 3156063-3166373_NCBI36/hg18) ทำให้เกิดการขาดหายไปทั้งยีน (whole gene deletion) ดังแสดงในรูปที่ 5



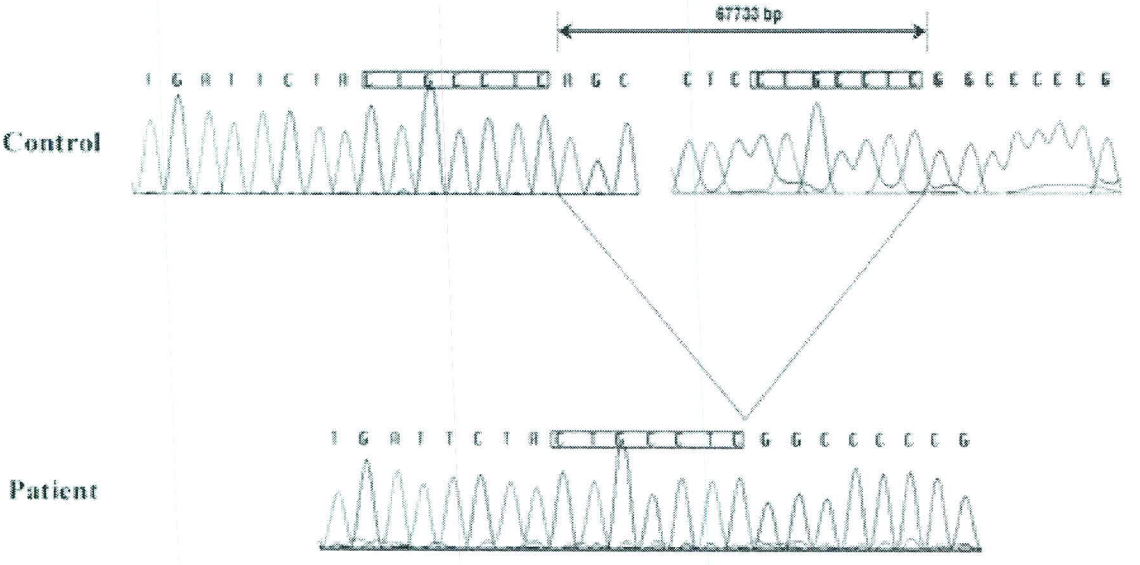
รูปที่ 5 array CGH แสดงการขาดหายไปของสารพันธุกรรมซึ่งบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยยีน *SLC4A11*

การกลายพันธุ์ชนิด deletion นี้ได้รับการยืนยืนอีกครั้งโดยวิธี PCR และพบว่าผู้ป่วยทั้งสามรายและบิดามี deletion ดังกล่าว ในขณะที่ไม่พบ deletion ในมารดา ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การทดลองโดย PCR เพื่อยืนยัน deletion พบการขาดหายดังกล่าวในผู้ป่วยและบิดา

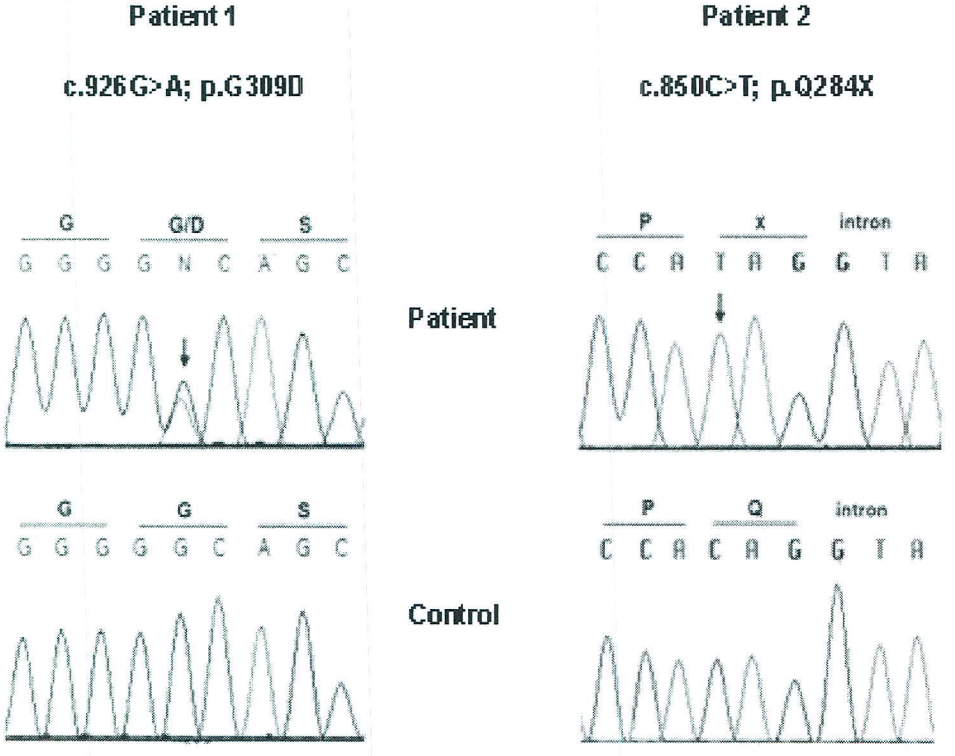
นอกจากนี้ได้ทำการหาจุดที่เกิดการขาดหายไป (deletion break points) ที่แน่นอนโดยวิธี PCR-sequencing พบการขาดหายไปมีขนาด 67,733 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 โครมาโตแกรมแสดงตำแหน่งนิวคลิโอไทด์ที่หายไปในผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ปกติในผู้ที่ไม่เป็นโรค

จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่า ผู้ป่วยทั้ง 3 รายมีการกลายพันธุ์ในยีน *SLC4A11* ทั้ง 2 อัลลีล โดยพบการกลายพันธุ์ชนิด missense ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดา และการกลายพันธุ์ชนิด whole gene deletion ซึ่งได้รับมาจากบิดา ผลการศึกษาทั้งหมด ดังแสดงในบทความ (manuscript) เรื่อง "Two novel mutations including a large deletion of the *SLC4A11* gene causing autosomal recessive hereditary endothelial dystrophy" ที่แนบมา (ภาคผนวก)

การศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน *CTNS* ในผู้ป่วยโรค cystinosis จำนวน 6 คนจากทั้งหมด 4 ครอบครัว ด้วยวิธี PCR-direct sequencing พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 อัลลีลซึ่งรวมทั้งการกลายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิดคือ c.926G>A (p.G309D) และ c.850C>T (p.Q284X) ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมแสดงการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยโรค cystinosis (ด้านซ้าย) การกลายพันธุ์ชนิด c.926G>A (p.G309D) (ด้านขวา) การกลายพันธุ์ชนิด c.850C>T (p.Q284X)

การวินิจฉัยโรคนี้อาศัยการตรวจตาที่พบผลึกที่มีลักษณะจำเพาะ (corneal crystals) และการเพิ่มขึ้นของระดับ cystine ในเม็ดเลือดขาว ลักษณะอาการและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ สรุปได้ดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางแสดงลักษณะอาการและการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยโรค cystinosis

Patient/ Ethnic group	Age of onset	Type	Inbred	WBC Cystine[1]	DNA change	Amino acid change	Novel
1/Thai	9 mo	Nephro-pathic	No	4.5	c.926G>A/ c.969C>G	p.G309D/ p.N323K	Yes No
2/Thai	7 mo	Nephro-pathic	Yes	NA	c.850C>T/ c.850C>T	p.Q284X/ p.Q284X	Yes Yes
3/Thai	15 mo	Nephro-pathic	No	NA	c.18-21del/ c.971-12G>A	T7fsX13	No No
4/Cam-bodian	13 y	Inter-mediate	Yes	0.5	c.969C>G/ c.969C>G	p.N323K/ p.N323K	No
5/Cam-bodian	10 y	Inter-mediate	Yes	0.5	c.969C>G/ c.969C>G	p.N323K/ p.N323K	No
6/Cam-bodian	18 mo	Inter-mediate	Yes	0.6	c.969C>G/ c.969C>G	p.N323K/ p.N323K	No

[1] Nanomoles of half-cystine/mg of WBC protein. Normal values are <0.2 and heterozygous values are less than 1.0.

ผลการศึกษาทั้งหมด ดังแสดงในบทความ (manuscript) เรื่อง "Two novel *CTNS* mutations in cystinosis patients in Thailand" ที่แนบมา (ภาคผนวก)

บทวิจารณ์

การศึกษาในผู้ป่วยโรค MPS ชนิดที่ 1 ที่มีอาการรุนแรง (MPS IH) พบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ในยีน *IDUA* ของผู้ป่วยทั้งสองอัลลีล และพบการกลายพันธุ์ใหม่ชนิด c.826G>A (p.E276K) ในผู้ป่วยที่เป็น MPS ชนิดที่ 1 ที่มีอาการรุนแรงน้อย (MPS IS) ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้ทำให้การทำงานของเอนไซม์ IDUA ลดลง

ก่อนหน้านี้ ได้มีการรายงานผู้ป่วยไทย 2 รายที่เป็น MPS IH และพบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ร่วมด้วย[24] เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวร่วมกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC เป็นจำนวนร้อยละ 50 (3 ใน 6 อัลลีล) เป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์นี้เป็นการกลายพันธุ์ที่พบ

บ่อยในผู้ป่วยไทยที่เป็น MPS IH การศึกษาหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่เป็น MPS IH จำนวนมากขึ้น จะทำให้ได้ข้อสรุปที่แน่ชัด ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยโดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย สำหรับผู้ป่วยที่เป็น MPS ชนิดที่ 1 ที่มีอาการรุนแรงน้อย พบมีการกลายพันธุ์ใหม่ชนิด c.826G>A (p.E276K) มีหลักฐานที่สนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค หลักฐานแรก คือ การที่ไม่พบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 50 คนหรือ 100 โครโมโซม หลักฐานที่สอง คือ การที่ตำแหน่ง 276 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนกลูตามิคเป็นตำแหน่งที่สงวน (conserved) และหลักฐานที่สำคัญที่สุด คือ เมื่อใส่ส่วนของ cDNA ของยีน *IDUA* ซึ่งมีการกลายพันธุ์ชนิด p.E276K เข้าไปในเซลล์ COS-7 พบว่า การทำงานของเอนไซม์ *IDUA* ลดลง การศึกษานี้ได้เพิ่มจำนวนการกลายพันธุ์ของยีน *IDUA* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค MPS ชนิดที่ 1

การศึกษาผู้ป่วยโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 จำนวน 3 รายจาก 1 ครอบครัว พบการกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) และการขาดหายไปซึ่งมีขนาดประมาณ 68 กิโลเบส ครอบคลุมยีน *SLC4A11* การกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

การกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) ในผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดา หลักฐานที่สนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ประกอบด้วย การกลายพันธุ์นี้ไม่พบในผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 50 คนหรือ 100 โครโมโซม กรดอะมิโนไลซีนที่ตำแหน่ง 260 เป็นบริเวณที่ conserved การกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนขั้วของกรดอะมิโนจากประจุบวกเป็นประจุลบ การทำนายผลกระทบของการกลายพันธุ์โดยโปรแกรม PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) และ SIFT (http://sift.jcvi.org/) พบการกลายพันธุ์มีผลต่อการทำงานของโปรตีนโดยมีคะแนน 1.000 โดยใช้โปรแกรม PolyPhen-2 และ 0.91 โดยใช้โปรแกรม SIFT

การศึกษาก่อนหน้านี้เพื่อหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้กับ CHED2 โดยวิธี PCR-sequencing บริเวณที่สร้างโปรตีนและบริเวณ promoter ของยีน *SLC4A11* ไม่พบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยบางราย[11-13, 16, 25] หลักฐานที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ได้ชี้บ่งว่าการขาดหายไปของยีน *SLC4A11* อีกหนึ่งอัลลีล เป็นสาเหตุของการเกิดโรค CHED2 การศึกษาโดยวิธี array CGH พบการขาดหายไปซึ่งมีขนาด 68 กิโลเบส ครอบคลุมยีน *SLC4A11* โดยได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา การทดลองเพิ่มเติมโดย PCR-directing sequencing สามารถพบตำแหน่งที่ขาดหายไปได้แน่นอนซึ่งมีขนาด 67,733 เบส บริเวณที่ขาดหายไปนี้อยู่ในบริเวณที่ได้มีการรายงานว่าเป็น deletion polymorphism ในฐานข้อมูล Database of Genomic Variant (DGV) (variation_5121). นอกจากนี้ พบมีส่วนที่ขาดหายไปขนาดแตกต่างกันอีก 4 แบบในบริเวณดังกล่าว การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า copy number variations (CNVs) ซึ่งรวมถึง microdeletions และ microduplications เป็นสาเหตุสำคัญของความผันแปรทางโครงสร้างพันธุกรรมของมนุษย์[26, 27] นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาหลายชิ้นได้บ่งชี้ว่า deletion polymorphisms อาจจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดลักษณะที่มีสาเหตุจากพหุปัจจัยและวิวัฒนาการด้านจีโนม.[28-31] นอกจากนี้ ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมในลักษณะด้อย เช่น ยีน *NEB* ในโรค nemaline myopathy และ ยีน *GCNT2* ใน congenital cataracts และ i blood group พบมีชนิดของการขาดหายไปในลักษณะดังกล่าว[32-35] การขาดหายไปที่เป็น microdeletion ในบริเวณที่พบจาก

การศึกษานี้อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับโรค CHED2 ในผู้ป่วยก่อนหน้านี้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ในส่วนที่สร้างโปรตีนของยีน *SLC4A11* การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสัดส่วนของการขาดหายไปที่เป็นสาเหตุของโรค CHED2 จะเป็นข้อมูลสำคัญในการพิจารณาเพื่อพัฒนาขั้นตอนหรือกระบวนการทดสอบทางพันธุกรรมในผู้ป่วยโรค CHED2 นำไปสู่การให้การวินิจฉัยและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *CTNS* ในผู้ป่วย 6 รายจาก 4 ครอบครัว พบการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด โดย 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด c.926G>A (p.G309D) และ ชนิด c.850C>T (p.Q284X) เป็นการกลายพันธุ์ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน โปรแกรม PolyPhen (http://coot.embl.de/PolyPhen/) ได้ทำนายว่า การกลายพันธุ์ชนิด c.926G>A (p.G309D) น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค โดยมีคะแนน 0.999 และตำแหน่งของกรดอะมิโนเป็นตำแหน่งที่สงวน (conserved) สำหรับการกลายพันธุ์ชนิด c.850C>T (p.Q284X) ทำให้เกิดการเปลี่ยนจากกลูตามีนที่ตำแหน่ง 284 เป็นรหัสหยุด การศึกษานี้ได้พบลักษณะการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึงความรุนแรงของอาการในผู้ป่วยได้และพบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในผู้ป่วยไทย