

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3*

จากผลการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3* ทั้ง 7 exon แล้วไม่สามารถหาลำดับเบสของ exon 1 ส่วนที่ 4 ได้ อาจเนื่องมาจาก

1) primer ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนในส่วนนี้เพียงพอจึงอาจไปเพิ่มขยายจำนวน DNA ในส่วนอื่นขึ้นมาโดยทำให้ได้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เท่ากันจึงทำให้ในขั้นตอนการ purify DNA ซึ่งถึงแม้จะทำการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการตัดเจลก่อนแล้วก็ยังมีการปนเปื้อนได้

2) จากงานวิจัยของ Posma AV และคณะพบว่ายีน *KCND3* และยีน *KCND2* มีกรดอะมิโนเหมือนกัน 66% และ 4 exon แรกมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าอาจมีการเพิ่มขยายผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *KCND2* ขึ้นมาซึ่งทำให้ได้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *KCND3* จึงทำให้เมื่อทำการหาลำดับเบสออกมาทำให้ได้ peak ซ้อนกันจึงอ่านผลไม่ได้

5.2 การวิเคราะห์ผลของ linkage analysis

จาก physical map⁵² genetic map⁵³ และผลการคำนวณค่า lod score ด้วย linkage program version 5.1 สามารถวิเคราะห์ผลของค่า lod score ที่ได้ของแต่ละครอบครัวในแต่ละ marker ได้ดังนี้

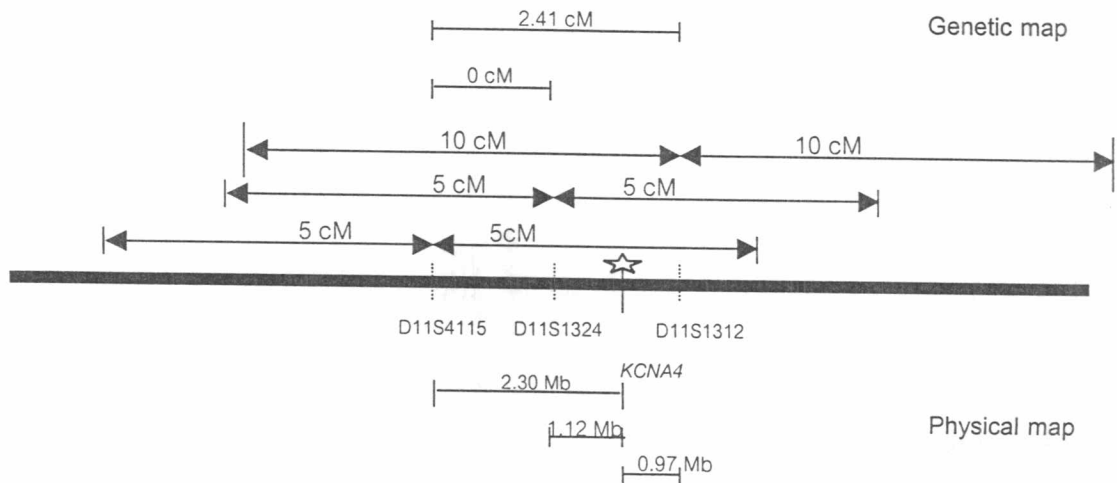
5.2.1 ยีน *KCNA4* ที่ตำแหน่ง marker ต่อไปนี้

ครอบครัว KEK

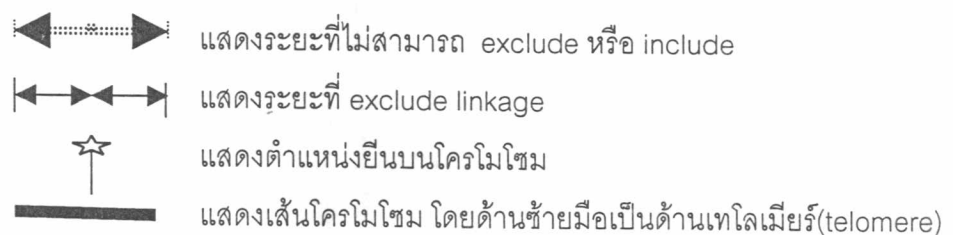
จากระยะห่างของ marker D11S1312 (ตารางที่ 4) และค่า lod score (ตารางที่ 16) ที่พบว่าสามารถ exclude linkage ในตำแหน่ง marker D11S1312 ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0 จนถึง 0.1 แสดงว่าสามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 10 cM ทั้งชายและขวา (ภาพที่ 14)

จากระยะห่างของ marker D11S1324 (ตารางที่ 4) และค่า lod score (ตารางที่ 16) ที่พบว่าสามารถ exclude linkage ในตำแหน่ง marker D11S1324 ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0 ถึง 0.05 แสดงว่าสามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 5 cM ทั้งชายและขวา (ภาพที่ 14)

จากระยะห่างของ marker D11S4115 (ตารางที่ 4) และค่า lod score (ตารางที่ 16) ที่พบว่าสามารถ exclude linkage ในตำแหน่ง marker D11S1312 ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0 จนถึง 0.05 แสดงว่าสามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 5 cM ทั้งซ้ายและขวา (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงระยะที่ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ต่างๆ ในครอบครัว KEK

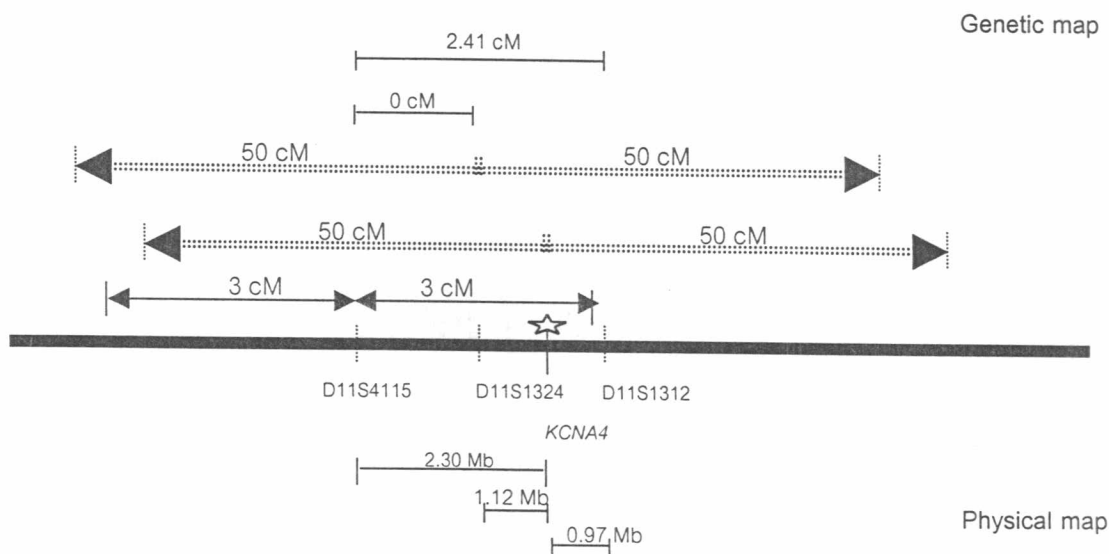


ดังนั้น จากภาพที่ 14 จะเห็นว่าสามารถ exclude linkage marker ที่อยู่ใกล้ยีน *KCNA4* ได้ทั้ง 3 marker และยีน *KCNA4* อยู่ในระยะที่ exclude linkage ด้วย ดังนั้นจึงแสดงว่า ครอบครัว KEK สามารถ exclude ยีนนี้ได้

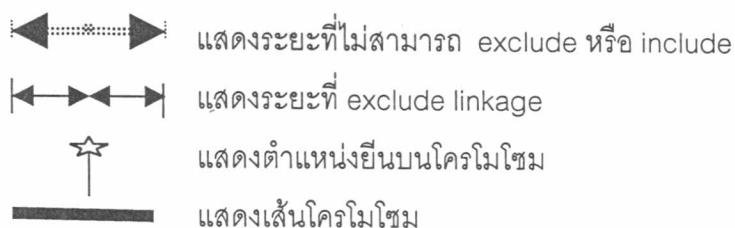
ครอบครัว IQ2I

จากระยะห่างของ ตำแหน่ง marker ต่างๆ (ตารางที่ 4) และค่า lod score (ตารางที่ 14 และ 15) ที่พบว่าไม่สามารถ exclude linkage ในตำแหน่ง marker D11S1312 และ D11S1324 ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0 จนถึง 0.5 แสดงว่าไม่สามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 5 cM ทั้งซ้ายและขวา และสามารถ exclude linkage D11S4115 ในตำแหน่ง marker

ได้ที่ θ เท่ากับ 0.01 จนถึง 0.03 แสดงว่าสามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 3 cM ทั้งซ้ายและขวา (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 แสดงระยะที่ exclude linkage และ ไม่สามารถ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ต่างๆ ในครอบครัว IQ21

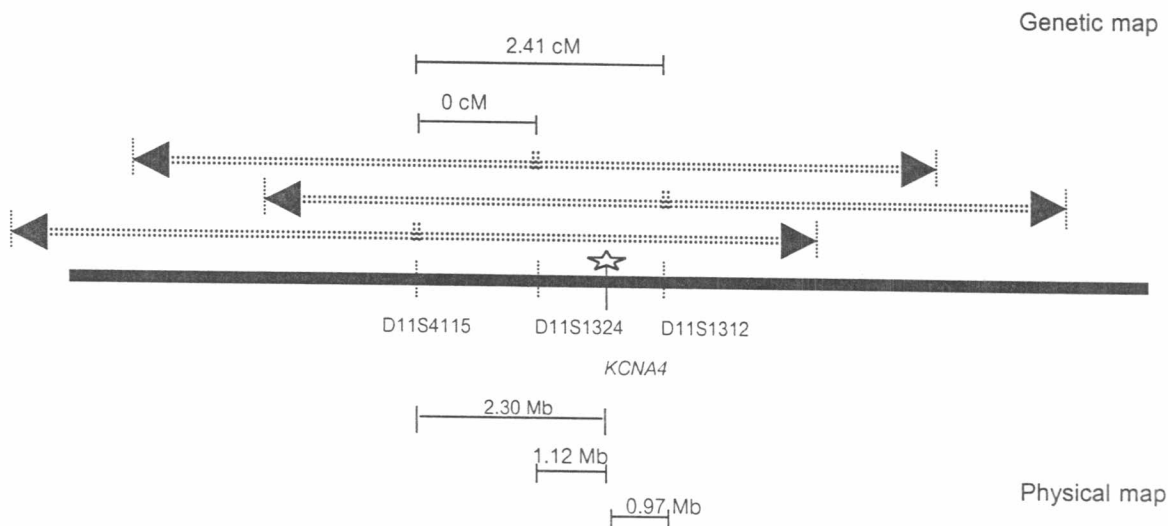


โดยด้านซ้ายมือเป็นด้านเทโลเมียร์ (telomere)

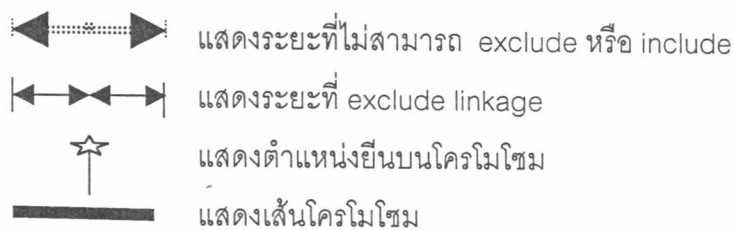
ดังนั้นจากภาพที่ 15 พบว่ายีน *KCNA4* อยู่ในระยะที่สามารถ exclude linkage ได้ ดังนั้นจึงสามารถ exclude linkage ยีนนี้ได้

ครอบครัว BNG

จากระยะห่างของ marker ต่างๆ (ตารางที่ 4) และค่า lod score (ตารางที่ 13) ที่พบว่าไม่สามารถ exclude linkage ในทุกตำแหน่ง marker ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0.01 จนถึง 0.5 แสดงว่าไม่สามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 50 cM ทั้งซ้ายและขวา (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 แสดงระยะที่ไม่สามารถ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ต่างๆ ในครอบครัว BNG



โดยด้านซ้ายมือเป็นด้านเทโลเมียร์(telomere)

ดังนั้นจากภาพที่ 16 แสดงว่าไม่สามารถ exclude หรือ include linkage ที่ตำแหน่ง marker ใกล้ยีน KCNA4 ทั้ง 3 marker นี้ได้

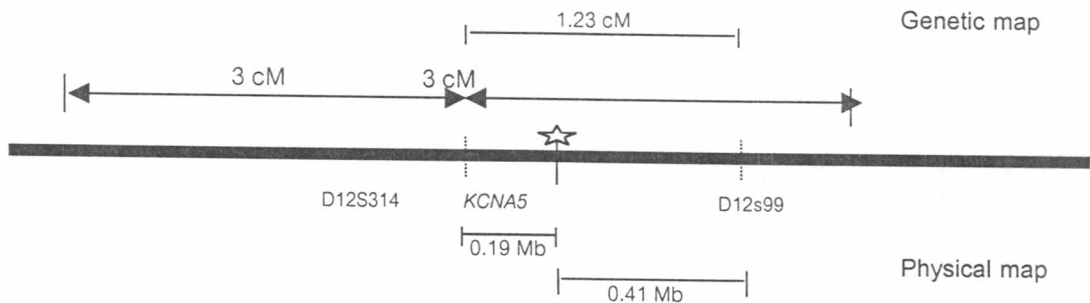
จากค่า lod score ในตารางที่ 13 ที่ไม่รวม BNG 130 131 132 133 134 135 และ 136 เนื่องจากสมาชิกคนที่ 132 133 134 135 และ 136 ในรุ่นที่ 3 ของครอบครัว BNG ไม่สามารถบอกได้ว่าอัลลีลที่เป็นโรคได้มาจากพ่อหรือแม่ พบว่าก็ยังไม่สามารถ exclude linkage ตำแหน่ง marker ทั้ง 3 นี้ได้

ดังนั้นแสดงว่าไม่สามารถ exclude linkage ตำแหน่งยีน KCNA4 ในครอบครัว BNG ได้





2.5.2 ยีน *KCNA5* ที่ตำแหน่ง marker ต่อไปนี้

จากระยะห่างของ marker D12S314 (ตารางที่ 4) และค่า lod score (ตารางที่ 19 และ 20) ที่พบว่าสามารถ exclude linkage ในตำแหน่ง marker D12S314 ของครอบครัว KEK ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0 จนถึง 0.03 แสดงว่าสามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 3 cM ทั้งซ้ายและขวา ดังภาพที่ 17

ส่วนในครอบครัว BNG และ IQ2I พบว่าไม่สามารถ exclude linkage ได้ที่ θ เท่ากับ 0 จนถึง 0.05 แสดงว่าไม่สามารถ exclude linkage จากตำแหน่งของ marker ห่างออกไป 50 cM ทั้งซ้ายและขวา (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 แสดงระยะที่ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ในครอบครัว BNG IQ2I และ KEK

-  แสดงระยะที่ไม่สามารถ exclude หรือ include
-  แสดงระยะที่ exclude linkage
-  แสดงตำแหน่งยีนบนโครโมโซม
-  แสดงเส้นโครโมโซม

โดยด้านซ้ายมือเป็นด้านเทโลเมียร์(telomere)

ดังนั้นจึงแสดงว่าสามารถ exclude linkage ในตำแหน่ง marker D12S314 ในตำแหน่งใกล้ยีน *KCNA5* ในครอบครัว KEK ได้ เนื่องจากยีน *KCNA5* อยู่ในระยะที่ exclude linkage ได้

เนื่องจาก marker D12S99 มีระยะห่างจากยีน *KCNA5* มากกว่า marker D12S314 และผลการทำ linkage analysis ในตำแหน่ง marker D12S314 พบว่าสามารถ exclude linkage ได้ และค่า lod score ของครอบครัว BNG และ IQ21 ที่มีค่าติดลบ แสดงว่ามีแนวโน้มที่ marker นี้ จะ exclude linkage ได้ ดังนั้นจึงอาจคาดเดาได้ว่า linkage analysis ของ marker D12s99 น่าจะสามารถ exclude linkage ได้เช่นเดียวกัน

จากค่า lod score ในตารางที่ 13 และ 19 ที่ผลการทำ linkage analysis ในตำแหน่ง marker ต่างๆ ของยีน *KCNA4* และ *KCNA5* ดังกล่าวข้างต้นพบว่าครอบครัว KEK สามารถ exclude linkage ได้ในหลายๆ ตำแหน่ง ในขณะที่ครอบครัว IQ21 สามารถ exclude linkage ได้ที่ θ เท่ากับ 0 ถึง 0.01 ในตำแหน่ง marker D11S4115 เท่านั้น ส่วนครอบครัว BNG ไม่สามารถ exclude linkage ได้ตั้งแต่ θ เท่ากับ 0.01 ถึง 0.5 ในทุก marker ซึ่งผลที่ได้ น่าจะเป็นเพราะว่า โรคไหลตายอาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนได้หลายยีน หรือที่เรียกว่า genetic heterogeneity คือ ในแต่ละครอบครัวสามารถเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ต่างกัน จึงทำให้ค่า lod score ที่ได้ไม่ไปในทางเดียวกัน

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าไม่สามารถ exclude ได้เนื่องจาก lod score มีค่าน้อยกว่า -2 แต่ก็ไม่สามารถ include linkage ได้เช่นกันเนื่องจากค่า lod score ที่ได้มีค่าไม่ถึง ถึง 3 ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีสมาชิกในครอบครัวไม่เพียงพอ หรือมีจำนวนครอบครัวน้อยเกินไป

5.3 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สามารถสรุปได้ว่าโรคไหลตายไม่น่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3* ในส่วนของ exon 2 ถึง exon 7 ส่วนใน exon 1 ยังไม่สามารถสรุปได้และควรมีการศึกษาต่อไปโดยอาจใช้วิธีการ Nested PCR หรือทำการ clone เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย และยีน *KCNA5* ไม่น่าจะมีการถ่ายทอดโครโมโซมไปในครอบครัวไหลตายแต่อาจมีการถ่ายทอดโครโมโซมในตำแหน่งยีน *KCNA4* ในครอบครัวไหลตาย BNG ได้ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาต่อไปเพื่อยืนยันผลที่ว่ามีการถ่ายทอดโครโมโซมในตำแหน่งยีน *KCNA4* โดยการทำการศึกษา linkage analysis เพิ่มอีกในครอบครัวอื่น หรือทำการติดตามสมาชิกคนอื่นในครอบครัวเดิมเหล่านี้ที่ยังไม่ได้เข้าร่วมการวิจัย หรือทำการตรวจกรองการพันธุ์ของยีนนี้ในผู้ป่วยไหลตายต่อไป หรือควรมีการศึกษาอื่นของช่องโปรตีนเชื่อมอื่นๆ ต่อไป