บทที่ 6

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาผู้ป่วย จำนวน 27 ราย จากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า โรงพยาบาลศิริราช และจากการสำรวจ จาก ต. บ้านถ่อน อ. ท่าบ่อ จ. หนองคาย ต. บ้านประทัดบุ อ. ประโคนชัย จ. บุรีรัมย์ และ ต. วังตะเคียน อ. วัดสิงห์ จ. ชัยนาท พบผู้ป่วยที่เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมตามข้อมูลของอาการทางคลีนิก พงศาวลี และผลทางห้องปฏิบัติการได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

<u>กลุ่มที่ 1</u>

กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ดูเชน/เบกเกอร์ (DMD/BMD) มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์ (X-linked recessive) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้จากโรงพยาบาล ถิ่นฐานของผู้ป่วยมีกระจายไปทั่วทุกภาค ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี อุดรธานี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ และกรุงเทพมหานคร เป็นต้น

นอกจากผลจากพงศาวลีที่ยืนยันการถ่ายทอดของโรคว่าเป็น การถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์แล้ว ยังมีผลทางห้องปฏิบัติการประกอบอีกหลายประการ เช่น การตรวจเอ็นไซม์บางชนิดที่เป็นตัวบ่งอาการผู้ป่วยว่าเป็น DMD คือ เอ็นไซม์ creatine phospho kinase (CPK) เอ็นไซม์ CPK ของคนปกติจะมีค่า อยู่ในช่วง 32 - 240 IU/L ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีค่าของเอ็นไซม์ CPK สูงกว่าค่าปกติ เนื่องจากมีการสูญเสียเอ็นไซม์ออกนอกเซลล์กล้ามเนื้อเข้าสู่ซีรัม จึงพบเอ็นไซม์ดังกล่าวสูงในซีรัมผู้ป่วย การตรวจเอ็นไซม์ในซีรัม สามารถตรวจในห้องปฏิบัติการชีวเคมีของโรงพยาบาลได้

ค่า CPK ของผู้ป่วยมีค่า อยู่ในช่วง 2210 - 32260 IU/L ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าปกติมาก ตามตารางที่ 3

นอกจากนี้ยังมีผลการตรวจชิ้นเนื้อ (muscle biopsy) การตรวจคลื่นไฟฟ้ากล้ามเนื้อ (electro myograph : EMG) จะให้รูปแบบของการเป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อม

ผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มนี้ คือ ผู้ป่วยรายที่ 1-16 มีแผนภูมิแสดงพงศาวลีที่ 1-13 เนื่องจากเป็นพี่-น้องกัน 2 คู่ (แผนภูมิที่ 3 และ 12) และในรายที่ 16 ไม่สามารถติดต่อครอบครัวผู้ป่วยได้ จึงขาดพงศาวลีประกอบการศึกษา แต่ผู้ป่วยรายนี้ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์แล้วว่า มีอาการทางคลีนิกบ่งว่าเป็นโรค DMD ภาพผู้ป่วยกลุ่มนี้แสดงลักษณะอาการ Gowers' sign ดังภาพที่ 27

ผลการตรวจการขาดหายไปของยีน ด้วยการใช้เทคนิค พีซีอาร์ ที่เรียกว่า มัลติเพลกซ์ พีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ ในการตรวจ จากการทดลองนี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบมัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ได้ 10 คู่ ในปฏิกริยาเดียว ต้องแยกทำเป็น 2 ปฏิกริยา เนื่องจากดีเอ็นเอเริ่มต้น หรือ ไพรเมอร์ ของเอกซอนที่ 6 มีค่า melting temperature (Tm) ต่ำมาก นอกจากนี้ ไพรเมอร์ทั้งหมด ได้สั่งสังเคราะห์จากบริษัท GSD, Canada ต่างจากการทดลองของ Beggs จึงทำให้การทดลองออกมาไม่เป็นไปตามการทดลองของ Beggs และคณะ ในปี 1990 คือ Beggs และคณะ สามารถ ใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ ใน มัลติเพลกซ์ พีซีอาร์ ปฏิกริยาเดียว ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงต้องแยกไพรเมอร์ที่ใช้ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเอกซอนที่ 6 ออกมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอีกปฏิกริยาหนึ่งเป็นปฏิกริยาที่ 2 ที่มีสภาวะต่างออกไป คือ มีอุณหภูมิของการ annealing และ elongation ต่ำลงจาก 65°C ในปฏิกริยาที่ 1 เป็น 60°C ในปฏิกริยาที่ 2 นอกจากนี้ยังลดปริมาณ dNTPs ลง และมีการใช้ไพรเมอร์ของเอกซอนคู่ที่ 50 ร่วมในปฏิกริยาที่ 2 ด้วย เพื่อเป็น internal control

ผลผลิตจากพีซีอาร์ (PCR product) ของเอกซอนที่ 6 มักจะให้แถบดีเอ็นเอที่จาง ซึ่งอาจทำให้การสรุปผลการทดลองผิดพลาดได้ สาเหตุที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มจางต่างกันแม้จะใช้ปริมาตรของผลิตผลพีซีอาร์ ที่เท่ากัน ในการทำอิเลกโทรโฟริซิส อาจมีการผิดพลาดในช่วงการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยน้ำ แต่ดีเอ็นเอมีลักษณะเหนียวการละลายในน้ำอาจไม่ดี หากต้องดูดดีเอ็นเอขึ้นมาใช้ในปริมาตรที่น้อยระดับไมโครลิตรความคลาดเคลื่อนของดีเอ็นเอที่จะได้ย่อมมีมาก เมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงเห็นความแตกต่างได้ชัดเจนจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจาง เข้มต่างกัน นอกจากนี้สิ่งสำคัญ คือ ต้องมี positive control (normal male) และ negative control (water) อยู่ในแต่ละปฏิกริยา โดยเฉพาะในปฏิกริยาที่ 2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเอกซอนที่ 6 ต้องการ internal control (คือ เอกซอนที่ 50) ด้วย

จากการตรวจการขาดหายไปของยีน ในผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 16 ราย ที่มีอาการเบื้องต้นบ่งว่าเป็น DMD ตรวจพบการขาดหายไปของยีนในผู้ป่วย 8 คน มี 1 คู่ที่เป็นพี่-น้องกัน (ผู้ป่วยรายที่ 13,14) ผู้ป่วยรายที่ 1,5,8,9 มี deletion รอบเอกซอนที่ 49 (เอกซอนที่ 43-52) และผู้ป่วย 2 คน (รายที่ 6,12) มี deletion ช่วงบริเวณปลาย 5' (5' terminus) (คือ Pm กับ เอกซอนที่ 3,6,13) ส่วนผู้ป่วยอีก 2 คน ซึ่งเป็นพี่น้องกัน (ผู้ป่วยรายที่ 13,14) พบ deletion ทั้งสองบริเวณที่กล่าวมา ซึ่งจะยืนยันสาเหตุของโรคอันเนื่องจากการขาดหายไปของยีนได้เป็นอย่างดี

การตรวจการขาดหายไปของยีนด้วยพีซีอาร์นี้ เป็นการตรวจสอบได้เพียงเล็กน้อย แต่รวดเร็ว สำหรับผู้ป่วยที่พบการขาดหายไปของยีน หมายความว่า ผู้ป่วยรายนั้นมีความผิดปกติแบบการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟิน ในช่วงที่การทดลองครอบคลุมได้ คือ เอกซอนที่ 43-52 และบริเวณโปรโมเตอร์ เมื่อตรวจพบว่าคนไข้คนใดมีลักษณะยีนเป็นประเภทมีการขาดหายไปของยีน จะเป็นประโยชน์ต่อครอบครัวของเขาในการวินิจฉัย

ก่อนคลอดให้กับบุตรชายคนต่อไปว่า จะเป็นโรคนี้อีกหรือไม่ โดยการตรวจหาการขาดหายไปของยีนได้จากเซลล์น้ำคร่ำได้ หากบุตรชายในครรภ์เป็น DMD จะมีแบบแผนของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับผู้ป่วยผู้พี่ แต่สำหรับผู้ป่วยที่ไม่พบการขาดหายไปของยีน จะไม่สามารถตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด หรือทำนายโรคก่อนแสดงอาการ (presymtom) ได้ด้วยวิธีนี้ ผู้ป่วยกลุ่มหลังนี้เกิดจากความผิดปกติ แบบพอยท์ มิวเตชัน ที่ลำดับเบสบนยีนดิสโทรฟิน การตรวจวินิจฉัยจะยุ่งยากขึ้นไปอีกโดยศึกษาจากทั้งครอบครัว

หากในการทดลองนี้ ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อีก 6 เอกซอน (เอกซอนที่ 8,17, 19,44,45,48) ตามที่ Chamberlain และคณะ (1988) ได้กล่าวไว้ อาจทำให้ตรวจพบการขาดหายไปของยีนได้มากขึ้น

<u>กลุ่มที่ 2</u>

กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ลิมบ์ - เกอร์เดิล (Limb - girdle muscular dystrophy : LMD) ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 17-20 ซึ่งเป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive) ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าโรคนี้มีการถ่ายทอดด้วยยีนด้อยบนออโตโซมเป็นส่วนใหญ่ (Harvey, 1983) พบผู้ป่วยกลุ่มนี้ทั้งชายและหญิงที่ ต. บ้านถ่อน อ. ท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย โดยเดินทางไปศึกษาพงศาวลี และอาการบางประการของผู้ป่วย จากการศึกษาพงศาวลีภาพที่ 32 พบว่าผู้ป่วยมีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนออโตโซม มีอาการอ่อนแรงทั้ง ในชายและหญิง แสดงว่าบิดามารดาของผู้ป่วยรายที่ 17 และ 18 เป็นพาหะ (carrier) ของโรคนี้ ทั้งคู่

อาการเริ่มแรก คือ การเดินแล้วล้มบ่อย แขน ขา ไม่มีแรง เริ่มอายุประมาณ 7 ปี กล้ามเนื้อส่วนหัวไหล่อ่อนแรง และเสื่อมจึงไม่สามารถยกแขนขึ้นตรง ๆ ได้ ผู้ป่วย

ที่พบ มีอายุราว 15-28 ปี ผู้ป่วยรายที่ 17 และ 18 เป็นญาติกับผู้ป่วยรายที่ 19 กับ 20 มีพงศาวลีดังภาพที่ 32 และ 33

กลุ่มที่ 3

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 3 นี้ เป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์ ที่มีการถ่ายทอดโรคเฉพาะในเพศชาย จากการศึกษาพงศาวลีพบว่าไม่ใช่โรค DMD/BMD เพราะ ช่วงอายุของผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอายุยืนยาวถึง 40 ปีกว่า และกล้ามเนื้อบริเวณหัวไหล่ยังใช้งานได้ดี ในผู้ป่วยอายุประมาณ 20 ปี จึงน่าจะนึกถึงโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด เอมเมอรี่ - ดริฟฟัสส์ (Emery-Dreffus muscylar dystrophy) มากที่สุด มีการเริ่มอาการ ของโรคประมาณอายุ 7 ปี อาการของโรคมีการพัฒนาไปอย่างไม่รุนแรง ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวถึง 40 กว่าปี ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีภูมิลำเนาอยู่ใน ต. วังตะเคียน อ.วัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท ได้แก่ผู้ป่วยรายที่ 21-27 มีพงศาวลีดังภาพที่ 36 และ 37

จากการศึกษาพงศาวลีผู้ป่วยรายที่ 1 (ภาพที่ 13) มารดาผู้ป่วยไม่ใช้สัญลักษณ์ของพาหะ เนื่องจากไม่สามารถระบุอย่างแน่ชัดได้ว่า ผู้ป่วยเกิดมิวเตชันที่ตัวผู้ป่วยเอง หรือสืบทอดมาทางมารดา เนื่องจากพงศาวลีไม่พบญาติชายฝ่ายมารดาเป็นโรคนี้เลย นอกจากนี้พงศาวลีดังภาพที่ 14,16,17,18,20,21,23 และ 25 ก็เป็นในลักษณะเดียวกัน

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ทำการศึกษาผู้ป่วยกล้ามเนื้อเสื่อมทั้งสิ้น 27 ราย เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์ รวม 16 ราย แต่พบการขาดหายไปของยีนเพียง 8 ราย ผู้ป่วยที่เหลือเป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดอื่น ได้แก่ ลิมป์ - เกอร์เดิล และ เอมเมอรี่ - ดริฟฟัสส์ เนื่อง จากโรคกล้ามเนื้อเสื่อมเป็นโรคที่พบไม่บ่อย (rare case) ผู้ทำการวิจัยจึงไม่สามารถศึกษาผู้ป่วยในจำนวนที่มากกว่านี้ได้ในระยะเวลาเพียง

1 - 2 ปี นอกจากนี้การเดินทางไปสำรวจผู้ป่วย ซึ่งส่วนใหญ่มีถิ่นฐานอยู่ต่างจังหวัด การเดินทางต้องใช้บุคคลากรหลายฝ่าย การเดินทางใช้ระยะเวลานาน และเป็นไปด้วยความลำบาก จึงเดินทางไปสำรวจได้จำกัดด้วยทุนในการวิจัย และดังที่กล่าวมาข้างต้น ผู้ป่วยมักอยู่ในชนบท ห่างไกลโรงพยาบาล โอกาสที่จะเดินทางมารับการตรวจโรคในโรงพยาบาลที่มีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง จึงเป็นไปได้น้อย อีกทั้งการถ่ายทอดของโรคพบได้ในเกือบทุกรุ่นและเสียชีวิต ชาวบ้านจึงเชื่อว่าเป็นโรคกรรมเก่า ซึ่งความจริงแล้วหากได้รับการแนะนำจากแพทย์ หรือผู้มีความเข้าใจ ครอบครัวผู้ป่วยจะมีแนวทางเลือกวางแผน หรือ ตัดสินใจมีบุตรที่เหมาะสมยิ่งขึ้น

สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ ยังสามารถดัดแปลงการเก็บเลือดผู้ป่วยให้ง่ายยิ่งขึ้น โดยการเก็บเลือดผู้ป่วยเป็นหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง เบอร์ 1 โดยเจาะเลือดจากปลายนิ้ว หรือจากเส้นเลือด โดยไม่ต้องใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดแต่อย่างใด ทิ้งให้แห้งแล้วนำมาต้ม ด้วย PCR buffer นำไปใช้ในปฏิกริยา พีซีอาร์ได้เลย ซึ่งวิธีนี้ประหยัด และสะดวกมาก สามารถเก็บหยดเลือดแห้ง (dry blood spot) ไว้ได้นานเป็นเดือน ๆ แต่ก็มีข้อเสียที่ไม่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของดีเอ็นเอที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และคุณภาพของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้จะไม่บริสุทธิ์เท่าดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม