

รูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายในประชากร  
ไทย



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  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2560  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCN5A gene exome sequencing profile in sudden unexplained nocturnal death  
syndrome in Thai population



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์               | รูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ใน<br>กลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายในประเทศไทย |
| โดย                             | นางสาวรัชติพรรณ ปิติวรารมย์  |
| สาขาวิชา                        | วิทยาศาสตร์การแพทย์  |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อุดมศักดิ์ ทุ่งวิจิตร   |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงดิ วงศ์ไพศาลสิน   |

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อุดมศักดิ์ ทุ่งวิจิตร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงดิ วงศ์ไพศาลสิน)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค)

รัชติพรรณ ปิติวรารมย์ : รูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายในประชากรไทย (*SCN5A* gene exome sequencing profile in sudden unexplained nocturnal death syndrome in Thai population) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ.อุดมศักดิ์ หนูทวีจิตร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน, 84 หน้า.

กลุ่มอาการ sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS) หรือไหลตายเป็นการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุพบมากในประชากรชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยผู้เสียชีวิตมักเป็นเพศชาย อายุระหว่าง 20 – 49 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่มีประวัติโรคประจำตัว ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าลักษณะทางระบาดวิทยาและอาการของกลุ่มอาการ SUNDS มีความใกล้เคียงกับกลุ่มอาการ Brugada syndrome (BrS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* นอกจากนี้ ยังพบว่ายีน *SCN5A* มีการแปรผันทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปในแต่ละประชากร วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษารูปแบบข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในประชากรไทยที่เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ด้วยวิธี Next-Generation sequencing (NGS)

ตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS จำนวน 43 รายถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน *SCN5A* ด้วยวิธี Next-Generation sequencing (NGS) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีค่า MAF < 0.01 จาก ExAC และค่าผลกระทบต่อโปรตีนระดับสูงหรือปานกลางจาก SnpEff จะถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทำนายความสามารถในการก่อโรค โดย missense variant จะวิเคราะห์ด้วย Polyphen-2 ส่วน frameshift variant หรือ stop gained variant จะวิเคราะห์ด้วย Mutationtaster และคัดด้วย CADD ซึ่งรวมผลที่ได้จากการทำนายที่ค่า < 20 ออก จากนั้น เปรียบเทียบผลกับ ClinVar และงานวิจัยก่อนหน้า ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS จะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเชิงพรรณนาด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 และ IBM SPSS statistic version 22.0.

การวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์หารูปแบบของลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ของผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS จำนวน 43 ราย โดยพบความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของ sodium channel จำนวน 7 ตำแหน่ง จากตัวอย่างของผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.28 แบ่งเป็น frameshift variant จำนวน 3 ตำแหน่ง และ stop gained variant จำนวน 4 ตำแหน่ง โดยมีเพียง W301X ซึ่งเคยพบในการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วน 6 ตำแหน่งที่เหลือ ได้แก่ A22fs, C906X, W1206X, W1395X, L1646fs และ E1804fs ไม่เคยมีรายงานมาก่อน แสดงให้เห็นว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* อาจมีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในประชากรไทย

การวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์หารูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในประชากรไทยได้ โดยข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบสามารถนำไปสู่การศึกษา functional analysis ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ระบุสาเหตุการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS และช่วยให้ญาติของผู้เสียชีวิตตระหนักถึงความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในอนาคตได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5774076030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: SUDDEN UNEXPLAINED NOCTURNAL DEATH SYNDROME (SUNDS) / SCN5A GENE / LAI-TAI / CHANNELOPATHIES / NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)

RACHTIPAN PITIWARAROM: *SCN5A* gene exome sequencing profile in sudden unexplained nocturnal death syndrome in Thai population. ADVISOR: ASST. PROF. UDOMSAK HOONWIJIT, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KORNKIAT VONGPAISARN SIN, M.D., 84 pp.

Sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS) or Lai-tai is sudden death that often occurs in Southeast Asia. SUNDS case characteristics are healthy young male, 20 – 49 yrs., sudden death during sleep and no relevant medical history. Previous studies found that SUNDS is similar with Brugada syndrome (BrS) which correlated to *SCN5A* mutations. Thus, *SCN5A* variations are different between populations. The aim of this study is to establish *SCN5A* gene exome sequencing profile for SUNDS in Thai population.

Postmortem genetic testing of *SCN5A* gene exome sequencing profile in 43 SUNDS cases using Next-Generation sequencing were analyzed and compared with healthy controls. Variants with MAF < 0.01 in ExAC and SnpEff annotated as high and moderate were filtered. Pathogenicity were predicted using Polyphen-2 for missense variants and Mutationtaster for frameshift and stop gained variants. For combine pathogenicity results, CADD score < 20 were filtered out. After that, *SCN5A* variants were compared with ClinVar and previous reports. Descriptive analysis were performed on SUNDS case characteristic. All statistical analysis were calculated using Microsoft Excel 2013 and IBM SPSS statistic version 22.0.

*SCN5A* gene exome sequencing profile in 43 SUNDS cases in Thai population were generated. Seven *SCN5A* rare variants from seven SUNDS cases (16.28%), three frameshift variants and four stop gained variants, were found which potentially significant that effect to sodium channel function. Only W301X has been previously reported. Other six novel rare variants are A22fs, C906X, W1206X, W1395X, L1646fs and E1804fs. This suggested that *SCN5A* variants maybe closely correlated with SUNDS cases in Thai population.

*SCN5A* gene exome sequencing profile for SUNDS case in Thai population were performed, which can be used to analyze functional that lead to SUNDS in further study. Moreover, *SCN5A* variants could be used as diagnostic testing for SUNDS and help the relatives to beware of risk to sudden death.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อุดมศักดิ์ หุ่นวิจิตรและผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยเหลือให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ด็อกเตอร์ ศักนัน พงศ์พันธุ์ผู้ภักดี นายแพทย์วีรภัทร โฆษิตานุกุทธิ์ และคณะจากภาควิชาสรีรวิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประสิทธิ์ เผ่าทองคำ ที่ให้คำปรึกษาในการแปลผลการวิจัย และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์อำนวยความสะดวกที่ให้ความช่วยเหลือให้การรวบรวมตัวอย่างและสืบค้นข้อมูลและพี่ๆห้องนิติเวชวิทยาที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่าน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา-มารดา และครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

## สารบัญ

หน้า

|  |    |
|--|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ง  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | จ  |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ฉ  |
| สารบัญ.....  | ช  |
| สารบัญภาพ .....  | ญ  |
| สารบัญตาราง.....   | ฎ  |
| บทที่ 1 .....  | 1  |
| บทนำ.....  | 1  |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                        | 1  |
| 1.2 คำถามของงานวิจัย .....                                     | 3  |
| 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....                              | 3  |
| 1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย.....                                    | 4  |
| 1.5 คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย .....                   | 5  |
| 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                             | 5  |
| บทที่ 2 .....  | 6  |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....                           | 6  |
| 2.1 Sudden unexplained nocturnal death syndrome .....          | 6  |
| 2.1.1 สาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS.....            | 6  |
| 2.1.2 การวินิจฉัยสาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS..... | 8  |
| 2.1.3 พยาธิสภาพที่ตรวจพบ.....                                  | 8  |
| 2.1.4 กลุ่มอาการ SUNDS และ BrS เหมือนกันหรือไม่ .....          | 13 |
| 2.2 SCN5A gene .....   | 16 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.1 โครงสร้างของยีน SCN5A.....   | 16 |
| 2.2.2 การสังเคราะห์โปรตีน SCN5A.....                                     | 16 |
| 2.2.3 การแสดงออกของโปรตีน SCN5A.....                                     | 17 |
| 2.2.4 โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน SCN5A.....                            | 17 |
| 2.2.5 ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A และกลุ่มอาการต่างๆ.....         | 20 |
| 2.2.6 ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้ทั่วไปของยีน SCN5A (Common variants) | 25 |
| 2.3 การตรวจวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม.....                          | 25 |
| 2.4 คุณสมบัติทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ.....                             | 27 |
| 2.5 ความแปรผันทางพันธุกรรม (Variation).....                              | 28 |
| บทที่ 3.....   | 29 |
| วิธีดำเนินงานวิจัย.....  | 29 |
| 3.1 รูปแบบการวิจัย.....  | 29 |
| 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....  | 29 |
| 3.3 การคัดเลือกตัวอย่าง.....   | 29 |
| 3.4 ขนาดตัวอย่าง.....  | 30 |
| 3.5 ขั้นตอนการวิจัย.....   | 31 |
| 3.5.1 การออกแบบชุดตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส.....                             | 31 |
| 3.5.2 การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ.....                                       | 32 |
| 3.5.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....  | 33 |
| 3.5.4 การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Next-Generation Sequencing.....   | 33 |
| 3.5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 41 |
| บทที่ 4.....   | 44 |
| ผลการวิจัย.....  | 44 |



|   |    |
|---|----|
| 4.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในตัวอย่างประชากรไทย .....  | 44 |
| 4.2 ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....   | 48 |
| 4.4 ผลคุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง Miseq .....  | 50 |
| 4.5 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของข้อมูล .....   | 51 |
| 4.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน <i>SCN5A</i> ในกลุ่มผู้เสียชีวิต<br>ชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม .....   | 51 |
| 4.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับเบสที่พบได้บ่อย (common<br>variants) บนยีน <i>SCN5A</i> .....   | 55 |
| บทที่ 5 .....   | 56 |
| สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....   | 56 |
| 5.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตจากไหลตายในประชากรไทย.....  | 56 |
| 5.2 สรุปผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอและการทำ Electrophoresis .....  | 57 |
| 5.3 สรุปผลคุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง Miseq .....  | 57 |
| 5.4 สรุปผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน <i>SCN5A</i> ที่มีการแปรผันซึ่งส่งผลกระทบต่อ<br>อย่างสูงจาก SnpEff ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม ..... | 57 |
| 5.5 สรุปผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน <i>SCN5A</i> ที่มีการแปรผันซึ่งไม่ทราบ<br>ความสำคัญแน่ชัด (Variants of unknown significant: VUS) .....               | 58 |
| 5.6 สรุปผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับเบสที่พบได้บ่อย (common<br>variants) บนยีน <i>SCN5A</i> .....   | 60 |
| 5.6 ข้อจำกัดของงานวิจัย.....  | 60 |
| 5.7 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ .....  | 61 |
| รายการอ้างอิง .....   | 62 |
| ภาคผนวก.....  | 69 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....  | 84 |

## สารบัญภาพ

หน้า

|  |    |
|--|----|
| ภาพที่ 1 แสดงการวินิจฉัยสาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS .....   | 8  |
| ภาพที่ 2 แสดง ECG ของกลุ่มอาการ Brugada syndrome จำแนกตามชนิดเทียบกับ normal.....  | 14 |
| ภาพที่ 3 แสดง SCN5A gene ทั้ง 28 exon ดัดแปลงจาก <sup>(30)</sup> .....   | 16 |
| ภาพที่ 4 แสดงโปรตีน SCN5A .....  | 18 |
| ภาพที่ 5 แสดงการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A ที่ตำแหน่งต่างๆ ตามกลุ่มอาการ .....   | 24 |
| ภาพที่ 6 แสดงหลักการ sequencing by synthesis ของ Illumina Miseq system.....  | 26 |
| ภาพที่ 7 แสดง action potential ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ.....  | 27 |
| ภาพที่ 8 แสดงการคำนวณขนาดตัวอย่างจากโปรแกรม PS.....  | 31 |
| ภาพที่ 9 ข้อมูลการออกแบบชุดตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม DesignStudio.....  | 32 |
| ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการเตรียม library ของ TruSeq Custom Amplicon .....  | 34 |
| ภาพที่ 11 TruSeq Index Plate Fixture.....  | 37 |
| ภาพที่ 12 แสดงการกระจายของข้อมูลโดย A แสดง histogram ของ BMI เป็นกราฟเบ้ซ้าย B แสดง histogram ของน้ำหนักหัวใจเป็นการแจกแจงปกติ.....  | 48 |
| ภาพที่ 15 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A A ในกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตาย B ในกลุ่มควบคุม.....  | 51 |
| ภาพที่ 16 แสดงตำแหน่งของความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff จากกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตาย (บน) และกลุ่มควบคุม (ล่าง) โดย variant ที่รู้อยู่แล้ว (สีฟ้า) และ variant ที่พบใหม่ (สีดำ) ..... | 52 |
| ภาพที่ 17 แสดงตำแหน่งของความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนโปรตีน SCN5A ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff โดย variant ที่รู้อยู่แล้ว (สีฟ้า) และ variant ที่พบใหม่ (สีดำ) .....  | 52 |

## สารบัญตาราง

|   | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์ช่วงน้ำหนักปกติของแต่ละอวัยวะภายในร่างกายมนุษย์ <sup>(22)</sup> .....   | 9    |
| ตารางที่ 2 แสดงสิ่งที่ตรวจพบจากการตรวจชั้นสุตรพลิกศพเพื่อวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันจากโรคหัวใจ <sup>(24)</sup> .....                      | 12   |
| ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของกลุ่มอาการ Brugada syndrome จำแนกตามชนิด .....  | 14   |
| ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสาเหตุ การวินิจฉัย และพยาธิสภาพที่ตรวจพบของกลุ่มอาการ SUNDS และ Brugada syndrome โดยสรุป .....                                     | 15   |
| ตารางที่ 5 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A ในกลุ่มอาการ SUNDS .....  | 23   |
| ตารางที่ 6 แสดงผลข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในตัวอย่างประชากรไทย .....   | 45   |
| ตารางที่ 7 แสดงผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวิจัยเบื้องต้น (14 ตัวอย่าง).....  | 48   |
| ตารางที่ 8 แสดงผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวิจัย 86 ตัวอย่าง .....  | 49   |
| ตารางที่ 9 คุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูล .....  | 50   |
| ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff จากกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม ..... | 53   |
| ตารางที่ 11 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ซึ่งเป็น variant ที่ทราบอยู่แล้ว (พบใน dbSNP หรืองานวิจัยก่อนหน้า).....                      | 54   |
| ตารางที่ 12 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยบนยีน SCN5A.....  | 55   |
| ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio.....  | 70   |
| ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตาย .....  | 81   |
| ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มควบคุม 83   |      |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กลุ่มอาการ sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS) หรือไหลตาย เป็นการเสียชีวิตที่พบมากในประเทศไทย (อุบัติการณ์ 38 ใน 10,000)<sup>(1)</sup> โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในอดีตมีความเชื่อที่เกิดจากผีแม่มาเอาชีวิต เนื่องจากผู้เสียชีวิตมักเป็นเพศชาย อายุระหว่าง 20 – 49 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่มีประวัติโรค เสียชีวิตกะทันหันระหว่างการนอนหลับโดยไม่ทราบสาเหตุ<sup>(2)</sup> โดยผู้เสียชีวิตมักมีประวัติบุคคลในครอบครัวเสียชีวิตโดยไม่ทราบสาเหตุเช่นกัน จึงเชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม

การศึกษาสาเหตุของกลุ่มอาการ SUNDS ในประเทศไทยในระยะแรกเชื่อว่า มีสาเหตุมาจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ<sup>(3)</sup> หรือความเครียด<sup>(4)</sup> จนกระทั่งในปีค.ศ. 2001 ญาณทัศนีย์จิต และคณะ ได้ทำการศึกษาเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ในประชากรไทย โดยใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้รอดชีวิตจากไหลตายและครอบครัวและทำการตรวจเฉพาะ exon 5, 12, 17, 18, 23 และ 28 ที่มีข้อมูลว่าพบการกลายพันธุ์ในกลุ่มอาการ Brugada syndrome (BrS) แต่ก็ไม่พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวพบแต่ polymorphism ที่ exon 5 และ 12<sup>(5)</sup>

ต่อมา ในปีค.ศ. 2002 Vatta M และคณะ ได้ทำการศึกษาเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* โดยใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้รอดชีวิตจาก SUNDS ในประชากรไทยและญี่ปุ่นจำนวน 10 ครอบครัว ด้วยวิธี SSCP, dHPLC และ direct sequencing พบการกลายพันธุ์ใน 3 ครอบครัวที่ตำแหน่ง R367H, A735V และ R1192Q ซึ่งการกลายพันธุ์ในสองตำแหน่งหลังนี้มีรายงานว่าพบในกลุ่มอาการ BrS มาก่อน งานวิจัยนี้จึงสรุปว่าลักษณะทางระบาดวิทยาและอาการของกลุ่มอาการ SUNDS เหมือนกับกลุ่มอาการ BrS และเป็นโรคเดียวกัน<sup>(6)</sup>

กลุ่มอาการ Brugada syndrome มีลักษณะอาการและอาการแสดง เช่น ภาวะหัวใจห้องล่างเต้นแผ่วระรัว เป็นลม หายใจติดขัดเวลานอน ใจสั่น และการแน่นหน้าอก<sup>(7)</sup> การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG) พบลักษณะ ST elevations ใน leads V1-V3 และ right bundle branch block (RBBB)<sup>(8)</sup> จากการศึกษาพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของกลุ่มอาการ BrS คือ cardiac channelopathy โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* สามารถพบได้ประมาณร้อยละ 20-25 จากผู้ป่วยทั้งหมด<sup>(9)</sup>

ยีน *SCN5A* หรือ voltage-gated cardiac sodium channel type 5, alpha subunit เป็นยีนในกลุ่ม sodium ion channel พบได้ที่กล้ามเนื้อหัวใจ ประกอบด้วย 28 exon<sup>(10)</sup> ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของประจุโซเดียมเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในการเกิด action potential ความแปรผันทางพันธุกรรมบนยีน *SCN5A* ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของโปรตีน และทำให้การเกิด action potential ผิดปกติไป<sup>(11)</sup>

โดยงานวิจัยในประเทศไทยทั้งสองดังกล่าวข้างต้น ใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้รอดชีวิตจากโหลตายซึ่งมีเกณฑ์ในการคัดเข้าคือการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบลักษณะแบบ BrS ซึ่งน่าจะถือเป็นกลุ่มผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ BrS มากกว่าจึงทำให้แปลผลว่ากลุ่มอาการ SUNDS และ BrS เป็นโรคเดียวกัน แตกต่างจากงานวิจัยของประชากรอื่นซึ่งใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS โดยตรง<sup>(12, 13)</sup> เช่น การศึกษาของ Liu C และคณะ ในปีค.ศ. 2014 ที่ทำการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ในประชากรอื่นที่เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ที่ตำแหน่ง V95I, R121Q และ R367H ซึ่งตรงกับที่พบในหลายๆการศึกษาก่อนหน้า และพบการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ตำแหน่งใหม่ ได้แก่ R513H, D870H, V1764D และ S1937F ที่แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าในกลุ่มอาการ BrS และในกรณี SUNDS ในประชากรอื่น<sup>(14)</sup>

วิธีการตรวจวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรม เดิมใช้วิธี Sanger sequencing ซึ่งมีข้อจำกัดคือราคาแพงและต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมากเนื่องจากต้องวิเคราะห์แต่ละ exon แยกกัน ต่อมาจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรมแบบใหม่ เรียกว่า Next-Generation sequencing (NGS) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในการตรวจครั้งเดียวและใช้ปริมาณตัวอย่างที่ลดลงจึงเหมาะกับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งมีตัวอย่างปริมาณน้อยและเสื่อมคุณภาพ<sup>(15)</sup> ได้มีการนำวิธี NGS มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรมในผู้เสียชีวิตแบบเฉียบพลันในประชากรจากหลายเชื้อชาติและพบความแปรผันทางพันธุกรรมในหลายๆยีนจากหลายตำแหน่ง<sup>(16, 17)</sup>

จากงานวิจัยในประเทศไทยดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยพบว่าการศึกษาโดยการใช้อุปกรณ์ตัวอย่างเป็นผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS และวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบลำดับสารพันธุกรรมบน exon ทั้งหมด (exome sequencing profile) ของยีน *SCN5A* ในประชากรไทย เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรมยังมีข้อมูลอยู่อย่างจำกัด

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ในประชากรไทยที่เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ว่ามีความแตกต่างจากชนชาติอื่นหรือไม่ ด้วยวิธี NGS เพื่อนำไปสู่การศึกษา functional analysis ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ระบุสาเหตุการเสียชีวิตจากกลุ่ม

อาการ SUNDS และช่วยให้ญาติของผู้เสียชีวิตตระหนักถึงความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในอนาคตได้

## 1.2 คำถามของงานวิจัย

### 1. คำถามหลัก

รูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS มีความแปรผันทางพันธุกรรมเป็นอย่างไร ด้วยวิธี NGS

### 2. คำถามรอง

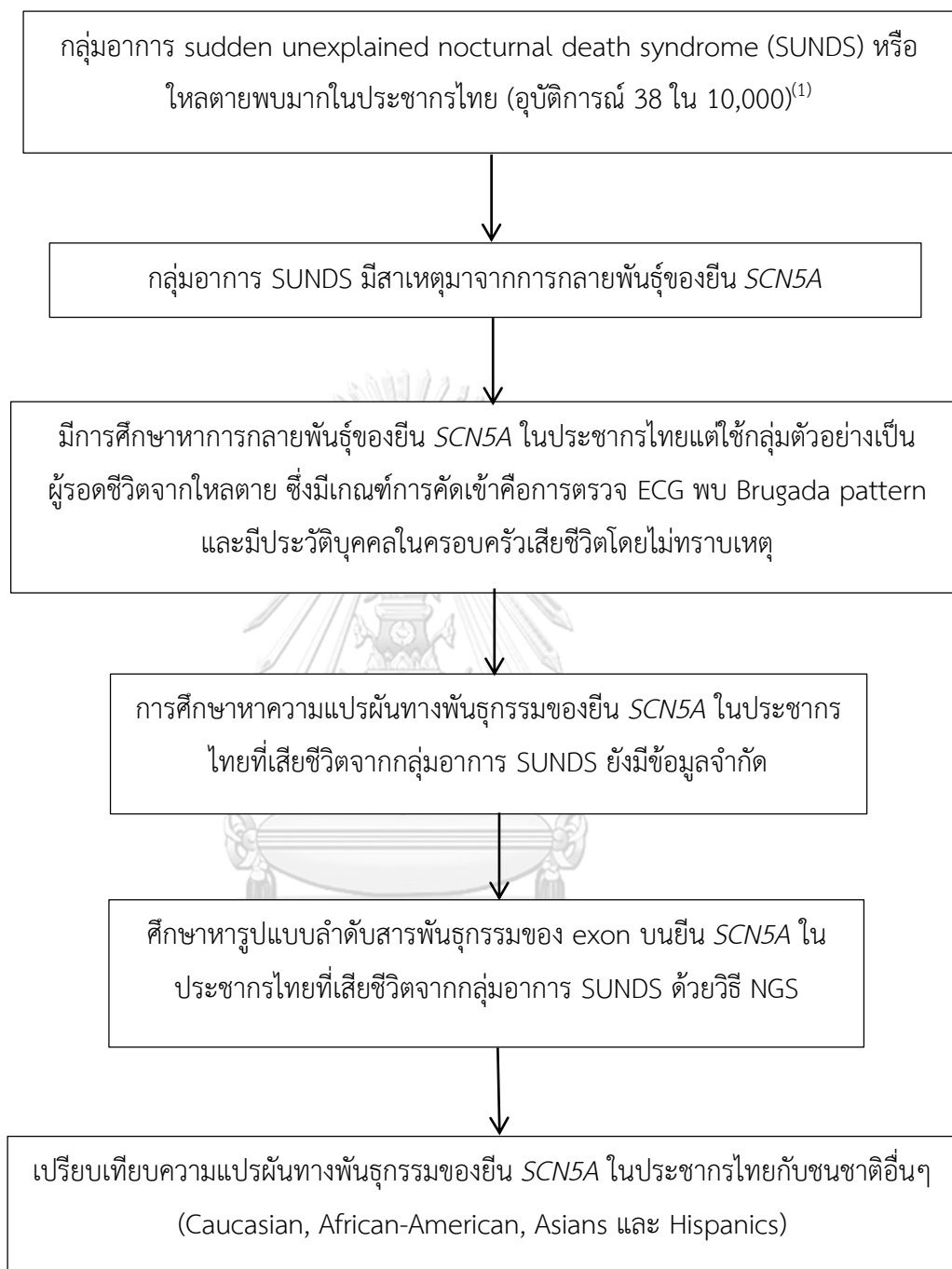
ความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในประชากรไทยแตกต่างจากชนชาติอื่น (Caucasian, African-American, Asians และ Hispanics) หรือไม่

## 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างฐานข้อมูลรูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ด้วยวิธี NGS

2. เพื่อเปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในประชากรไทยกับชนชาติอื่น (Caucasian, African-American, Asians และ Hispanics)

#### 1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



## 1.5 คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย

### 1.5.1 นิยามของกลุ่มอาการ SUNDS คือ

1. การตายอย่างกะทันหัน
2. การตายที่มักเกิดในเวลากลางคืน มักพบในเพศชาย อายุน้อย ไม่มีเหตุตายอื่นปรากฏจากการตรวจศพ

### 1.5.2 ความแปรผันทางพันธุกรรม (Variation, Variants)

การเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอโดยอาจเกิดได้หลายลักษณะ เช่น การเปลี่ยนของลำดับเบส (SNP) การเพิ่มขึ้นของลำดับเบส (insertion) และการลดลงของลำดับเบส (deletion) แต่ในที่นี้จะแบ่งกลุ่มตามความแปรผันทางพันธุกรรมระดับโปรตีน ได้แก่

1. Frameshift variant การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสระหว่างจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน และจุดหยุดการสังเคราะห์ซึ่งเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงแล้ว ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเคลื่อนไป
2. Stop gained variant การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเป็นจุดหยุดการสังเคราะห์ซึ่งเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงแล้ว ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนหยุดลง
3. Missense variant การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงแล้ว ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์เปลี่ยนแปลงไปเฉพาะในตำแหน่งนั้น เนื่องจากยังไม่เป็นที่แน่ชัดในการแปลผลความสำคัญของความแปรผันทางพันธุกรรมนี้ว่าส่งผลกระทบต่อโปรตีนมากน้อยเพียงใด จึงเรียกรวมว่า ความแปรผันทางพันธุกรรมซึ่งไม่ทราบความสำคัญแน่ชัด (Variants of unknown significant: VUS)

นอกจากนี้ ยังมีนิยามอื่นๆ ได้แก่

1. Common variant ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย
2. Known variant ความแปรผันทางพันธุกรรมที่ทราบอยู่แล้ว โดยมีรายงานใน dbSNP หรือเคยพบในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้
3. Novel variant ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบใหม่

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ไปใช้ในการวินิจฉัยการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ได้
2. ข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ที่พบสามารถช่วยให้ญาติของผู้เสียชีวิตตระหนักถึงความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในอนาคตได้



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 Sudden unexplained nocturnal death syndrome

กลุ่มอาการ sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS) หรือไหลตาย เป็นการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุของคนวัยหนุ่มสาว ซึ่งพบมากในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีรายงานการพบกลุ่มอาการ SUNDS ครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ ในปีค.ศ. 1917 กลุ่มอาการ SUNDS มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น bangungut ในประเทศฟิลิปปินส์ และ pokkuri ในประเทศญี่ปุ่น<sup>(18)</sup> โดยผู้เสียชีวิตมักเป็นเพศชาย อายุระหว่าง 20 – 49 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่มีประวัติโรคประจำตัวและเสียชีวิตกระทันหันระหว่างการนอนหลับโดยไม่ทราบสาเหตุ<sup>(2)</sup>

อุบัติการณ์ของกลุ่มอาการ SUNDS พบมากในประเทศญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ (อุบัติการณ์ 43 ใน 10,000) และไทย (อุบัติการณ์ 38 ใน 10,000) โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกาพบอุบัติการณ์ของกลุ่มอาการ SUNDS มากในกลุ่มผู้อพยพจากลาวหรือมีเชื้อสายลาว<sup>(1)</sup>

##### 2.1.1 สาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS

การเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS นั้น ยากที่จะบ่งบอกสาเหตุได้อย่างแน่ชัด แต่ก็มีการศึกษาในหลายงานวิจัยในอดีต ซึ่งอาจสรุปได้เป็น 2 ปัจจัยหลัก คือ

##### 1. ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม

##### a. ภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ (hypokalemia)

ภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจห้องล่างเต้นแผ่วระรัวซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS โดยภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำนี้พบมากในคนไทยที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งอาจเนื่องมาจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีโปแตสเซียมต่ำ<sup>(3)</sup> นอกจากนี้ อาจเกิดจากโรคที่ทำให้โปแตสเซียมต่ำ เช่น hypokalemic periodic paralysis, distal renal tubular acidosis และโรคนี้วไต<sup>(19)</sup>

##### b. ความเครียด

จากการศึกษาของ Goh KT และคณะในปี ค.ศ.1993 ซึ่งทำการศึกษาในคนงานไทยที่ทำงานในประเทศสิงคโปร์ที่พบการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS เป็นจำนวนมาก พบว่าคนงานไทยใน

ประเทศสิงคโปร์มีความเครียดสูงจากการต้องปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ๆ การแยกจากครอบครัว เป็นหนี้ และชั่วโมงการทำงานที่ยาวนาน<sup>(4)</sup>

c. การกตการหายใจ ภาวะขาดออกซิเจน และภาวะเลือดเป็นกรด (Hypoventilation, hypoxemia and Acidosis)

อาการขาดอากาศหายใจมักเกิดขึ้นก่อนการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในเวลากลางคืน มีอาการแสดง เช่น หายใจเร็วกว่าปกติ คราง หอบ และกรน นอกจากนี้ การรบกวนการหลับเนื่องจากการตีบของทางเดินหายใจส่วนบนและการกตการหายใจมักเกิดขึ้นระหว่างการนอนหลับระยะกรอกตาเร็ว ซึ่งทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจน จึงสามารถใช้ในการอธิบายว่าเหตุใดกลุ่มอาการ SUNDS จึงมักเสียชีวิตในเวลากลางคืนได้

ภาวะเลือดเป็นกรดเป็นผลมาจากการกตการหายใจ ภาวะขาดออกซิเจน และการขาดโปแตสเซียมเรื้อรังโดยน่าจะส่งผลให้เกิดกลุ่มอาการ SUNDS ซึ่งจากการทำ Whole-cell patch clamp พบว่า ภาวะเลือดเป็นกรดทั้งภายในและภายนอกเซลล์ทำให้กระแสของประจุโซเดียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

d. การนอนละเมอ (Night terrors)

การนอนละเมอ และการฝันร้ายก่อให้เกิดกลุ่มอาการ SUNDS ได้โดยการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาร์เทติก ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะเกิด Ventricular arrhythmia ในผู้ป่วยด้วย Cardiac conduction defect (CCD)

e. Remnant Lipoprotein และ Coronary artery vasospasm

ระดับของ Remnant Lipoprotein ที่สูงขึ้นใน plasma อาจส่งผลให้หลอดเลือดหัวใจแคบลงโดยทำลายความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด ซึ่งจะไปกระตุ้นตัวรับ LOX-1 และกลไก Rho-kinase ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทำให้หลอดเลือดหัวใจหดตัว ซึ่งมีผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตายและมีการปล่อยโปแตสเซียมออกมาบริเวณนั้น จึงเกิด Ventricular arrhythmia และหัวใจวายได้<sup>(18)</sup>

## 2. ปัจจัยจากพันธุกรรม

กลุ่มอาการ SUNDS เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนหลายชนิดซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 สาเหตุหลัก ได้แก่

a. Cardiomyopathy คือการเกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจ พบการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นโครงสร้างของกล้ามเนื้อหัวใจ เช่น โรค hypertrophic cardiomyopathy (HCM) ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน *ACTC1* และ *GLA* ฯลฯ<sup>(20)</sup>

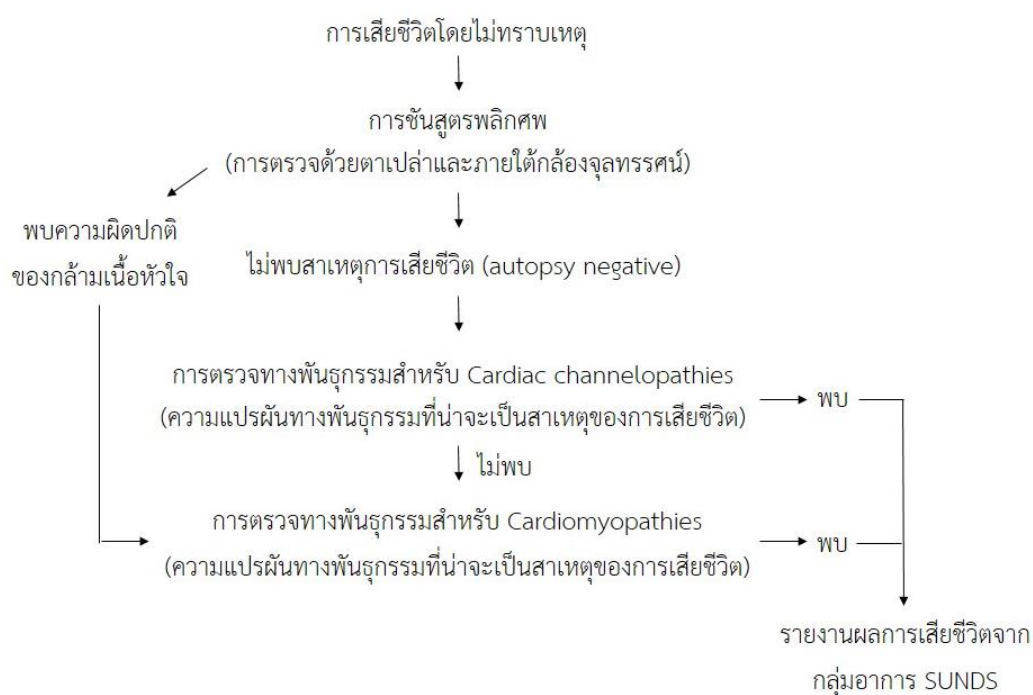
b. Cardiac channelopathy พบการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นโครงสร้างของ ion channel โดยเฉพาะ sodium ion channel และ potassium ion channel ยีนดังกล่าว เช่น *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1* และ *KCNE2*<sup>(21)</sup>

ในปัจจุบัน Zheng และคณะ ได้เสนอสมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDs ไว้ว่าเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่

1. ปัจจัยทางพันธุกรรม โดยพบความแปรผันทางพันธุกรรมในคนอายุน้อย
2. ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น ความเครียด ดังที่กล่าวข้างต้น
3. การเกิดการรบกวนการทำงานของ action potential ในเวลากลางคืนขณะนอนหลับ<sup>(18)</sup>

### 2.1.2 การวินิจฉัยสาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDs

การวินิจฉัยสาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDs<sup>(20)</sup> แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการวินิจฉัยสาเหตุของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDs

### 2.1.3 พยาธิสภาพที่ตรวจพบ

1. การตรวจร่างกายภายนอก ไม่พบบาดแผลภายนอก ร่างกาย
2. การผ่าชันสูตร ไม่พบสาเหตุการเสียชีวิตจากการผ่าชันสูตร (autopsy negative) ตรวจประเมินอวัยวะภายในเบื้องต้นด้วยน้ำหนักร่างกาย ซึ่งมีเกณฑ์ช่วงปกติ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์ช่วงน้ำหนักปกติของแต่ละอวัยวะภายในร่างกายมนุษย์<sup>(22)</sup>

| อวัยวะ  | น้ำหนัก (กรัม) |           |
|---------|----------------|-----------|
|         | เพศหญิง        | เพศชาย    |
| สมอง    | 1275           | 1400      |
| หัวใจ   | 200 – 280      | 270 – 360 |
| ปอดซ้าย | 325 – 480      |           |
| ปอดขวา  | 360 – 570      |           |
| ตับ     | 1500 – 1800    |           |
| ม้าม    | 150 – 200      |           |
| ไต      | 230 – 440      | 240 – 350 |
| ตับอ่อน | 86 – 179       | 104 – 186 |

การผ่าชันสูตรหัวใจ ตามมาตรฐานของ Basso C., et al. (2008) Association for European Cardiovascular Pathology

1. ตรวจเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardium) ผ่าเปิดเพื่อตรวจช่องเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardial cavity)
2. ตรวจลักษณะทางกายภาพของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta และ pulmonary trunk) ก่อนตัด บริเวณ 3 ซม. เหนือ aortic valve และ pulmonary valve
3. ตรวจ pulmonary veins และตัดเหนือ superior vena cava 2 ซม. บริเวณเหนือจุดที่ crest of the right atrial appendage บรรจบกับ superior vena cava (เพื่อรักษาสภาพ sinus node) ตัด inferior vena cava บริเวณใกล้กระบังลม
4. ผ่าเปิดหัวใจห้องบนขวา (right atrium) จาก inferior vena cava ลงไปที่ apex of the appendage ผ่าเปิดหัวใจห้องบนซ้าย (left atrium) บริเวณระหว่าง pulmonary veins ลงไปที่ atrial appendage ตรวจช่องว่างภายในและผนังกั้นระหว่างหัวใจห้องบนและประมาณหา foramen ovale ตรวจสอบ mitral valves และ tricuspid valves จากด้านบนและตรวจความสมบูรณ์ของ papillary muscles และ chordae tendineae
5. ตรวจ aorta, pulmonary artery, aortic valves และ pulmonary valves จากด้านบน
6. ตรวจหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจ (coronary arteries):
  - a. ตรวจสอบขนาด รูปร่าง ตำแหน่ง จำนวน และการอุดตันของ coronary ostia

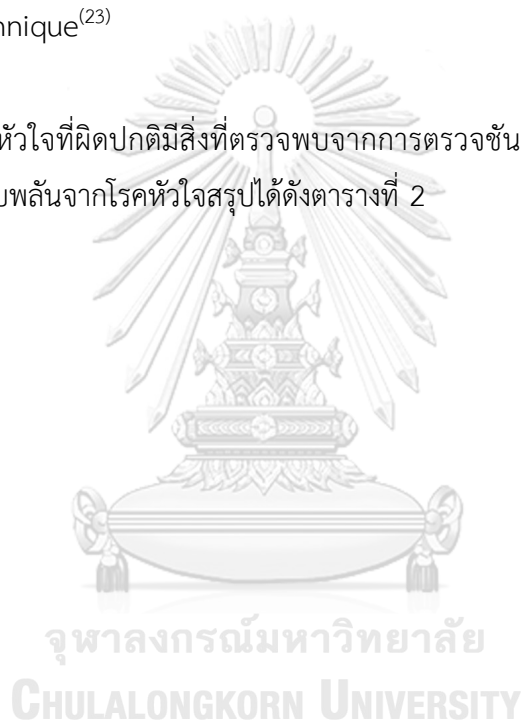
- b. ประเมินขนาดและการไหลของ major epicardial arteries ทั้ง 3 เส้นคือ left anterior descending artery (LAD), left circumflex artery (LCX) และ right coronary artery (RCA) แล้วประเมินว่าหลอดเลือดไหนเลี้ยงเป็นหลัก
  - c. ตัดหลอดเลือดเป็นแนวตัดขวางหลายๆ ครั้งห่างกันครั้งละ 3 มม. ตาม main epicardial arteries และแขนง เพื่อตรวจว่ามีการอุดตันหรือไม่
  - d. หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจที่มีการสะสมของหินปูนอย่างรุนแรงให้ผ่าเปิดโดยกรรไกรที่คม ถ้าไม่สามารถทำได้ ควรเอาส่วนที่สมบูรณ์ออก ละลายแคลเซียมและผ่าเปิดในแนวตัดขวาง
  - e. ถ้าหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจมีขดลวด (จากการทำบอลูน) ควรส่งให้ห้องแล็บทำ resin embedding
  - f. หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจที่มีการทำบายพาสควรตรวจโดยการตัดขวาง บริเวณที่เชื่อมต่อกัน ของส่วนต้นและส่วนปลายควรตรวจอย่างระมัดระวัง
7. ตัดขวางหัวใจที่ mid-ventricular level และสไลด์ตัดหัวใจห้องล่าง (ventricles) ขนาดต่างๆ 1 ซม. ไปจนสุดปลายและประเมินลักษณะรูปร่างของผนังและช่องว่างของหัวใจห้องล่างในแต่ละชิ้น
8. ดูดเลือดในหัวใจออกจนหมด แล้ววัดสิ่งต่อไปนี้
- a. น้ำหนักของหัวใจ: ประเมินน้ำหนักของหัวใจเปรียบเทียบกับตารางของน้ำหนักปกติของหัวใจจำแนกตามอายุ เพศและน้ำหนัก
  - b. ความหนาของผนังหัวใจ: ตรวจเยื่อหัวใจ (endocardium) วัดความหนาของช่องว่างตรงกลางของหัวใจห้องล่างซ้ายและขวาและผนังกันห้องหัวใจ (รวมทั้ง trabeculae ด้วย) เปรียบเทียบกับตารางของความหนาปกติของหัวใจจำแนกตามอายุ เพศและน้ำหนัก
  - c. ขนาดของหัวใจ: วัดขนาดของหัวใจในแนวขวางคำนวณจากระยะห่างระหว่าง obtuse ถึง acute margin ใน posterior atrioventricular sulcus วัดขนาดของหัวใจในแนวยาวโดยวัดระยะห่างระหว่าง crux cordis และ apex ของหัวใจในมุมมองจากด้านหลัง
9. ฝ่าฐานครึ่งของหัวใจ (basal half of the heart) และตรวจผนังกันระหว่างหัวใจห้องบนและล่าง atrioventricular valves ทางเข้าและออกของหัวใจห้องล่างและ semi-lunar valves

3. การตรวจทางพยาธิวิทยา ไม่พบความผิดปกติจากการตรวจดูชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์  
ทำการตรวจกล้ามเนื้อหัวใจทางพยาธิวิทยาตามมาตรฐาน

วิธีมาตรฐานในการตรวจกล้ามเนื้อหัวใจทางพยาธิวิทยาของ Basso C., et al. (2008)  
Association for European Cardiovascular Pathology

เลือกภาคตัดขวางของหัวใจห้องล่างมาเป็นตัวแทนโดยเลือกชิ้นที่มีผนังของหัวใจห้องล่างซ้าย (ด้านหน้า ด้านข้างและด้านหลัง) ผนังกั้นหัวใจห้องล่าง (ด้านหน้าและด้านหลัง) ผนังของหัวใจห้องล่างขวา (ด้านหน้า ด้านข้างและด้านหลัง) ทางออกของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular outflow tract) และหัวใจห้องบนห้องละ 1 ชิ้น รวมทั้งชิ้นเนื้อที่มีบริเวณผิดปกติที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า ย้อมชิ้นเนื้อด้วย H & E และ connective tissue stain (van Gieson, trichrome หรือ Sirius red) หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจ: บริเวณที่มีพยาธิสภาพเฉพาะที่อย่างรุนแรงควรเก็บมาตรวจด้วยวิธีข้างต้น รวมทั้งบริเวณอื่นของหัวใจ เช่น เนื้อเยื่อลิ้นหัวใจ เยื่อหุ้มหัวใจและ aorta ถ้ามีประวัติโรคหรือการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบว่ามีลักษณะผิดปกติ ควรทำ conduction system investigation โดย serial sections technique<sup>(23)</sup>

ลักษณะของหัวใจที่ผิดปกติมีสิ่งที่ตรวจพบจากการตรวจชันสูตรพลิกศพเพื่อวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันจากโรคหัวใจสรุปได้ดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 แสดงสิ่งที่ตรวจพบจากการตรวจชันสูตรพลิกศพเพื่อวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันจากโรคหัวใจ<sup>(24)</sup>

| Certain   | Highly Probable  | Uncertain  |
|---|--|--|
| Massive pulmonary embolism  | Stable atherosclerotic plaque with luminal stenosis >75% with or without healed myocardial infarction                            | Minor anomalies of the coronary arteries from the aorta (RCA from the left sinus, LCA from the right without inter-arterial course, high take-off from the tubular portion, LCx originating from the right sinus or RCA, coronary ostia plication, fibromuscular dysplasia, intramural small vessel disease) |
| Haemopericardium due to aortic or cardiac rupture   | Anomalous origin of the LCA from the right sinus and inter-arterial course   | Intra-myocardial course of a coronary artery (myocardial bridge)   |
| Mitral valve papillary muscle or chordae tendineae rupture with acute mitral valve incompetence and pulmonary edema | Cardiomyopathies (hypertrophic, arrhythmogenic right ventricular, dilated, others)   | Focal myocarditis, hypertensive heart disease, idiopathic left ventricular hypertrophy   |
| Acute coronary occlusion due to thrombosis, dissection or embolism  | Myxoid degeneration of the mitral valve with prolapse, with atrial dilatation or left ventricular hypertrophy and intact chordae | Myxoid degeneration of the mitral valve with prolapse, without atrial dilatation or left ventricular hypertrophy and intact chordae  |
| Anomalous origin of the coronary artery from the pulmonary trunk  | Aortic stenosis with left ventricular hypertrophy  | Dystrophic calcification of the membranous septum (±mitral annulus/aortic valve)   |
| Neoplasm/thrombus obstructing the valve orifice   | ECG documented ventricular pre-excitation (Wolff–Parkinson–White syndrome, Lown Ganong Levine syndrome)                          | Atrial septum lipoma   |
| Acute coronary occlusion due to thrombosis, dissection or embolism  | Myxoid degeneration of the mitral valve with prolapse, with atrial dilatation or left ventricular hypertrophy and intact chordae | Myxoid degeneration of the mitral valve with prolapse, without atrial dilatation or left ventricular hypertrophy and intact chordae  |
| Anomalous origin of the coronary artery from the pulmonary trunk  | Aortic stenosis with left ventricular hypertrophy  | Dystrophic calcification of the membranous septum (±mitral annulus/aortic valve)   |
| Neoplasm/thrombus obstructing the valve orifice   | ECG documented ventricular pre-excitation (Wolff–Parkinson–White syndrome, Lown Ganong Levine syndrome)                          | Atrial septum lipoma   |
| Thrombotic block of the valve prosthesis  | ECG documented sinoatrial or AV block  | AV node cystic tumor without ECG evidence of AV block, conducting system disease without ECG documentation   |
| Laceration/dehiscence/poppet escape of the valve prosthesis with acute valve incompetence                           | Congenital heart diseases, operated  | Congenital heart diseases, un-operated with or without Eisenmenger syndrome  |

Massive acute myocarditis

AV atrioventricular; ECG electrocardiogram; LCA left coronary artery; LCx left circumflex branch; RCA right coronary artery

4. การตรวจทางนิติพิษวิทยา ตรวจหาสารพิษที่อาจทำให้เสียชีวิตอย่างเฉียบพลัน โดยเก็บ peripheral blood จาก femoral veins 10 มิลลิลิตร และน้ำปัสสาวะ 30 – 50 มิลลิลิตร สิ่งที่ตรวจได้แก่

blood alcohol level < lethal dose (400 – 450 mg/dL)

ตรวจคัดกรองยาเสพติดในกลุ่ม methamphetamine และ morphine groups ต้องได้ผลเป็นลบ<sup>(25)</sup>

#### 2.1.4 กลุ่มอาการ SUNDS และ BrS เหมือนกันหรือไม่

กลุ่มอาการ Brugada syndrome (BrS) ถูกค้นพบโดย Pedro และ Josep Brugada ในปี ค.ศ.1992 และเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงต่อการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันในคนวัยหนุ่มสาว<sup>(26)</sup> สาเหตุการเกิดกลุ่มอาการ BrS สามารถจำแนกได้เป็น 2 ปัจจัยหลักคือ

1. ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม มักเกิดจากการมีแคลเซียมหรือโปแตสเซียมสูงในเลือดหรือภาวะโปแตสเซียมต่ำ หรืออาจเกิดจากยาที่ใช้ในการรักษาโรคหัวใจ เช่น ยารักษาหัวใจเต้นผิดจังหวะ ยา รักษาอาการเจ็บหน้าอก ยารักษาความดันโลหิตสูง ยารักษาโรคซึมเศร้า และยาในกลุ่ม antihistamine, calcium channel blocker, bupivacaine และ propofol นอกจากนี้ อุณหภูมิของร่างกายก็มีผลต่อการควบคุมการไหลของประจุโซเดียม โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของ ion channel ซึ่งทำให้สามารถพบ Brugada pattern ในการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจของคนที่เป็นใช้ได้

2. ปัจจัยจากพันธุกรรม เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นโครงสร้างของ ion channel หรือเรียกว่า cardiac channelopathy โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ซึ่งเป็น sodium ion channel สามารถพบได้ประมาณร้อยละ 20 – 25 จากผู้ป่วยทั้งหมด<sup>(9)</sup> และยังพบการกลายพันธุ์ของยีนอื่นๆ ที่เป็นโครงสร้างของ ion channel ได้แก่

a. sodium ion channel เช่น *SCN1B*, *SCN3B*

b. potassium ion channel เช่น *KCND3*, *KCNE3*, *KCNJ2*

นอกจากนี้ จากการศึกษายังพบว่ากลุ่มอาการ BrS มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนอื่นๆ ในกลุ่มที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ ion channel เช่น Multicopy suppressor Of temperature-sensitive Gsp1 (*MOG1*)<sup>(27)</sup> และ Glycerol-3 phosphate dehydrogenase-1 Like (*GPD1-L*)<sup>(7)</sup>



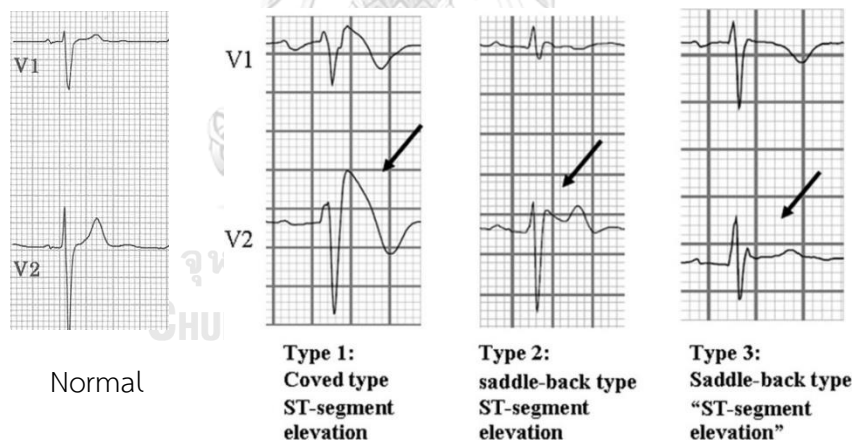
การวินิจฉัย ลักษณะสำคัญที่พบในผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ BrS คือ การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG) พบลักษณะ ST elevations ใน leads V1-V3 และ right bundle branch block (RBBB)<sup>(8)</sup> กลุ่มอาการ BrS แบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ตรวจพบ ได้แก่ Type 1, Type 2 และ Type 3 (ตารางที่ 3, ภาพที่ 2) โดยการวินิจฉัยว่าเป็นกลุ่มอาการ BrS มีเฉพาะ Type 1 covered type เท่านั้น ส่วน Type 2 และ Type 3 จะวินิจฉัยว่าเป็นกลุ่มอาการ BrS เมื่อได้รับ sodium channel blocker แล้วเกิด ECG Type 1 ขึ้น<sup>(26)</sup>

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของกลุ่มอาการ Brugada syndrome จำแนกตามชนิด

| Diagnostic Criteria for Brugada Syndrome (From 1 <sup>st</sup> Consensus Document) ST-Segment Abnormalities in Leads V1-V3 |                      |                      |                 |
|--|----------------------|----------------------|-----------------|
|  | Type 1               | Type 2               | Type 3          |
| J-point  | ≥2 mm                | ≥2 mm                | ≥2 mm           |
| T-wave   | Negative             | Positive or biphasic | Positive        |
| ST-T configuration   | Coved type           | Saddleback           | Saddleback      |
| ST segment (terminal portion)  | Gradually descending | Elevated ≥1 mm       | Elevated < 1 mm |

1 mm = 0.1 mV, the terminal portion of the ST segment refers to the latter half of the ST segment. From Wilde et al.<sup>3</sup> with permission.

ที่มา : [http://www.askdrwiki.com/mediawiki/index.php?title=Brugada\\_syndrome](http://www.askdrwiki.com/mediawiki/index.php?title=Brugada_syndrome)



ภาพที่ 2 แสดง ECG ของกลุ่มอาการ Brugada syndrome จำแนกตามชนิดเทียบกับ normal  
ที่มา:Brugada pattern:<http://circep.ahajournals.org/content/5/3/606/F3.expansion.html>

Normal ECG: <http://ecg.utah.edu/lesson/3>

นอกจาก Brugada syndrome แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลให้ ST segment สูงขึ้น เช่น การได้รับ sodium channel blocker<sup>(7)</sup>

อาการและอาการแสดงของกลุ่มอาการ Brugada syndrome คือภาวะหัวใจห้องล่างเต้นแผ่วระรัว เป็นลม หายใจติดขัดเวลานอน ใจสั่น และการแน่นหน้าอก อาการเหล่านี้พบได้มากในขณะพัก หรือนอนหลับ โดยเฉพาะการเป็นลมพบได้บ่อยที่สุด<sup>(7)</sup>

ความแตกต่างของลักษณะสาเหตุ การวินิจฉัย และพยาธิสภาพที่ตรวจพบของกลุ่มอาการ SUNDS และ Brugada syndrome โดยสรุป ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสาเหตุ การวินิจฉัย และพยาธิสภาพที่ตรวจพบของกลุ่มอาการ SUNDS และ Brugada syndrome โดยสรุป

|                                 | SUNDS   | Brugada syndrome  |
|---------------------------------|---|---|
| ลักษณะ                          | การเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุของคนวัยหนุ่มสาว  | กลุ่มอาการป่วยซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันในคนหนุ่มสาว               |
| สาเหตุ<br>-ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม | -ภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ<br>-ความเครียด ฯลฯ  | -ยา<br>-ไข้   |
| -ปัจจัยจากพันธุกรรม             | -Cardiomyopathies<br>-Cardiac channelopathy ยีน SCN5A ฯลฯ   | -Cardiac channelopathy<br>20-25% มีการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A                              |
| การวินิจฉัย                     | -Autopsy negative<br>-การตรวจทางพันธุกรรมของยีนในกลุ่ม Cardiomyopathies และ Cardiac channelopathy               | ECG: Brugada pattern<br>ST elevations ใน leads V1-V3 และ right bundle branch block (RBBB) |
| พยาธิสภาพที่ตรวจพบ              | การตรวจร่างกายภายนอก การผ่าชันสูตร การตรวจทางพยาธิวิทยา และการตรวจทางนิติพยาธิวิทยา ไม่พบสาเหตุการเสียชีวิตอื่น | ภาวะหัวใจห้องล่างเต้นแผ่วระรัว เป็นลม หายใจติดขัดเวลานอน ใจสั่น และการแน่นหน้าอก          |

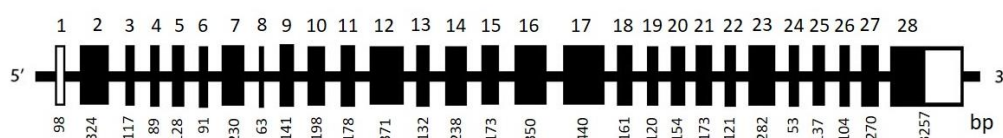
## 2.2 SCN5A gene

SCN5A gene หรือ voltage-gated cardiac sodium channel type 5, alpha subunit ชื่ออื่นๆ ได้แก่ Nav1.5 (ENSG00000183873, HGNC: 10593, NCBI Gene ID: 6331) พบได้ที่กล้ามเนื้อหัวใจเป็นยีนในกลุ่ม sodium ion channel

### 2.2.1 โครงสร้างของยีน SCN5A

SCN5A gene มีขนาด 80 kb อยู่บนโครโมโซม 3p21 ประกอบด้วย 28 exons<sup>(10)</sup> ดังภาพที่ 2 โดย exon 1 และบางส่วนของ exon 2 เป็น 5' untranslation region (5'UTR) และส่วนปลายของ exon 28 เป็น 3' untranslation region (3'UTR)<sup>(28)</sup>

SCN5A gene ประกอบด้วย 6 isoform ขึ้นอยู่กับการ splicing ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละเนื้อเยื่อ อายุ และสปีชีส์โดยลักษณะการ splicing ที่พบในหัวใจมนุษย์มากที่สุดคือ Nav1.5c (SCN5A-014) ซึ่งมีการเติมกลูตามีนที่ตำแหน่ง 1077 (Q1077) ที่ปลาย 5' ของ exon 18 สัตว์ส่วนการถอดรหัสของ Nav1.5:Nav1.5c มีค่าคงที่คือ 2:1 มีการศึกษาพบว่าการ splicing ในยีน SCN5A มีบทบาทสำคัญใน SCN5A channelopathy เช่น Long QT syndrome type 3 หรือ Brugada syndrome โดยการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A แบบ loss-of-function ที่ตำแหน่ง G1406R จะส่งผลกระทบต่อความหนาแน่นของประจุโซเดียมและจลนศาสตร์ทั้งในผู้ป่วยและคนปกติที่มี polymorphism H558R, S524Y หรือ R1193Q<sup>(29)</sup>



ภาพที่ 3 แสดง SCN5A gene ทั้ง 28 exon ดัดแปลงจาก<sup>(30)</sup>

### 2.2.2 การสังเคราะห์โปรตีน SCN5A

การสังเคราะห์โปรตีน SCN5A เริ่มจากการถอดรหัส (transcription) ได้ RNA จากนั้นจึงเกิด RNA processing และการสังเคราะห์โปรตีนที่ endoplasmic reticulum (ER) แล้วโปรตีน SCN5A จะถูกหลั่งออกจาก ER ไปที่ sarcolemma เพื่อทำงาน โดยมักไปอยู่บริเวณ intercalated disc แต่ก็อาจพบที่ lateral membranes และ T-tubular system ได้ ระหว่างนั้นจะเกิด post-translational modification, จับกับ cytoskeleton หรืออาจเก็บไว้ใน subcellular compartment และประกอบเป็น multiprotein complex สุดท้ายจึงเกิด endocytosis ที่เยื่อหุ้มเซลล์นั้นและถูกทำลาย<sup>(28)</sup>

### 2.2.3 การแสดงออกของโปรตีน SCN5A

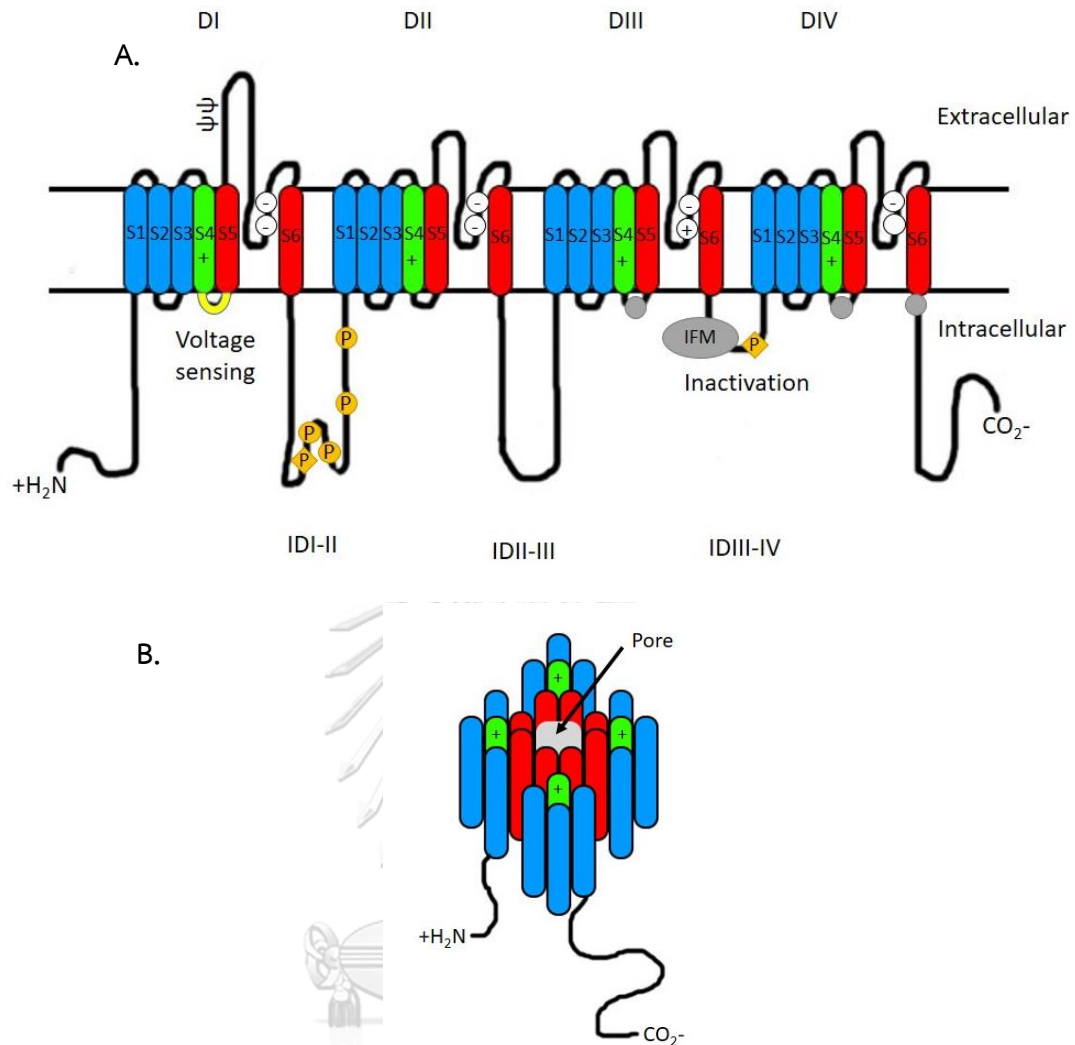
การแสดงออกของโปรตีน SCN5A พบมากที่สุดที่หัวใจ โดยพบมากที่สุดที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และ conductive tissue ส่วนบริเวณ sinoatrial node (SA node) และ atrioventricular node (AV node) จะพบน้อย และยังพบการแสดงออกของโปรตีน SCN5A ในบริเวณอื่นๆของร่างกาย เช่น กล้ามเนื้อเรียบที่ลำไส้เล็ก และแมคโครฟาจ นอกจากนี้ ยังมีการแสดงออกของโปรตีน “neonatal” splice SCN5A ในระบบประสาทและโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งไม่มีการศึกษาวิจัยแน่ชัดถึงหน้าที่ของโปรตีน SCN5A ที่แสดงออกบริเวณดังกล่าว<sup>(31)</sup>

### 2.2.4 โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน SCN5A

โปรตีน SCN5A มีจำนวน 2016 กรดอะมิโน (สำหรับ SCN5A-014) ขนาด 277 kDa อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบด้วย 4 homologous domains (DI-IV) เชื่อมต่อกันด้วย short linking intracellular domains (IDI-II, IDII-III และ IDIII-IV) แต่ละโดเมนประกอบด้วย 6 transmembrane segments (S1 – S6)<sup>(10)</sup> ดังภาพที่ 4A (S1-S3 (สีฟ้า), S4 (สีเขียว), S5-S6 (สีแดง) ซึ่งเป็นสาย  $\alpha$ -helix มีโครงสร้างที่สำคัญคือ S4 ซึ่งมีประจุบวก เกี่ยวข้องกับการเปิดของ ion channel เมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้าเปลี่ยนไป (voltage-dependent activation of the channel) โดยบริเวณระหว่าง S4-S5 (เส้นสีเหลือง) เป็นตำแหน่งของ Voltage sensing ในขณะที่ inactivation gate ประกอบด้วย intracellular IDIII-IV loop และ C-terminal domain ที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อน บริเวณของช่องไอออนประกอบด้วย S6 และ P loop ที่เชื่อมระหว่าง S5 – S6 ของแต่ละ domain<sup>(28)</sup>

ภาพที่ 4A แสดงโครงสร้างของโปรตีน SCN5A ซึ่งสัญลักษณ์ต่างๆมีความหมาย ดังนี้

1. ตำแหน่ง  $\Psi$  แสดงถึงบริเวณที่อาจเกิด N-linked Glycosylation
2. ตำแหน่ง P แสดงถึงบริเวณที่เกิด Phosphorylation โดย protein kinase A (วงกลม) และ protein kinase C (สี่เหลี่ยม)
3. วงกลมสีขาว ด้านนอก (EEDD) และด้านใน (DEKA) เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านของ sodium channel และจับกับ tetrodotoxin
4. ตำแหน่ง IFM แสดงถึง inactivation particle โดยจะรวมกับตำแหน่ง วงกลมสีเทา 3 ตัว (QQQ) เป็น inactivation gate receptor<sup>(32)</sup>



ภาพที่ 4 แสดงโปรตีน SCN5A

A แสดงโครงสร้างของโปรตีน SCN5A ดัดแปลงจาก<sup>(32)</sup>

B แสดงการประกอบโปรตีน SCN5A เป็น sodium ion channel<sup>(33)</sup> ดัดแปลงจาก<sup>(34)</sup>

โปรตีน SCN5A (alpha subunit) เป็น integral membrane proteins ทำงานเกี่ยวข้องกับ action potentials โดยจะประกอบกับโปรตีน SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B (beta subunit,  $\beta$ 1-4) เป็นโครงสร้างของ sodium ion channel (ภาพที่ 4B) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของประจุโซเดียมในการเคลื่อนเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ในขณะระยะพัก (resting membrane potential) ความต่างศักย์ไฟฟ้าของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอยู่ที่  $-90$  mV sodium channel จะปิดอยู่ และเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิด action potential จากความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างประจวบภายนอกเซลล์และประจุลบภายในเซลล์ จะทำให้ S4 ซึ่งมีประจวบสูงและทำหน้าที่เป็น voltage sensor เคลื่อนเข้ามา ส่งผลให้ sodium channel เปิดออกและ

เกิด depolarization (ระยะ 0) ความต่างศักย์ไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจเปลี่ยนจาก  $-90$  mV ไปเป็น  $+10$  mV

กลไกในขณะที่ sodium channel เปิดออกเกิดขึ้นโดยประจุโซเดียมจะเคลื่อนเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทางช่องไอออนซึ่งประกอบจาก S6 และ P loop ที่เชื่อมระหว่าง S5 – S6 ของแต่ละ domain โดยมีโครงสร้างที่สำคัญเรียกว่า DEKA ring ประกอบด้วยกรดอะมิโนสี่ตัวคือ กรดแอสพาทิก กรดกลูตามิก ไลซีนและอะลานีน ทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านของ sodium channel

ส่วนการปิดของ sodium channel นั้น แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

1. Fast inactivation เป็นกลไกปกติของ sodium channel โดยการทำงานของ IFM (isoleucine-phenylalanine-methionine) ซึ่งอยู่บริเวณ intracellular IDIII-IV loop (ตำแหน่งที่ 1485–1487) ร่วมกับกลูตามีน 3 ตัว (QQQ) ดังแสดงในภาพที่ 4A กรดอะมิโนเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic เมื่อ sodium channel เปิดออก จึงทำงานร่วมกันเพื่อกระตุ้นให้มีการปิด sodium channel อย่างรวดเร็ว

2. Intermediate inactivation เกิดขึ้นกับเฉพาะบาง sodium channel ซึ่งส่งผลให้กลับสู่ระยะ repolarization ช้า (ใช้เวลาประมาณ 50 วินาที) กลไกของ Intermediate inactivation ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของโครงสร้างของ sodium channel เช่น ช่องไอออน P-loop และ voltage-sensor

3. Slow inactivation จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการ prolong ของระยะ depolarization  $> 60$  วินาที โดยเฉพาะหากเกิดความผิดปกติของโปรตีนจากความแปรผันทางพันธุกรรมบริเวณ extracellular domains 3 ตำแหน่งดังนี้ คือ บริเวณ DIVS4 บริเวณ loop ระหว่าง S5–S6 ของ DII และบริเวณ DIIS6<sup>(34)</sup>

ในขณะที่เกิด action potential กระแสของประจุโซเดียมบางส่วนจะยังคงอยู่และไม่เกิด inactivation ทั้งหมด ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า 'late current' หรือ ' $I_{Na,L}$ ' นอกจากนี้ยังมี sodium channel บางส่วนที่จะเกิด activation ขึ้นอีกครั้งก่อนที่ inactivation จะเสร็จสมบูรณ์ เรียกว่า window current ซึ่งส่งผลกระทบต่อโรคต่างๆหลายโรค<sup>(31)</sup> ดังจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

#### Post-translation modification

กระบวนการ Post-translation modification ของโปรตีน SCN5A ที่สำคัญ มีดังนี้

1. Glycosylation เกี่ยวข้องกับการทำงานของ sodium channel ทั้ง activation และ inactivation การศึกษาในหนูที่ขาด ST3Gal4 (sialyltransferase) พบว่าการขาดกระบวนการนี้ทำให้เกิด depolarization เพิ่มขึ้น และเร่งการกลับสู่ภาวะปกติจาก fast inactivation

## 2. Phosphorylation แบ่งตามชนิดของเอนไซม์ได้ ดังนี้

- a. protein kinase A (PKA) เกี่ยวข้องกับการ trafficking ความแปรผันทางพันธุกรรมที่ส่งผลกระทบต่อบริเวณที่ PKA มาจับทำให้การควบคุมการ trafficking ผิดปกติ (เช่น R526H ในกลุ่มอาการ BrS)
  - b. protein kinase C (PKC) กระตุ้นให้เกิดการลดลงของ  $I_{Na}$  amplitude เนื่องมาจากการกระจายของช่องโซเดียมออกจากเยื่อหุ้มเซลล์และการ trafficking ภายในเซลล์
  - c. CaMKII เกี่ยวข้องกับการทำงานของช่องโซเดียมและกระตุ้นให้กระแสของประจุโซเดียมยังคงอยู่หลังระยะ depolarization ความแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง S571 และตำแหน่งใกล้เคียง (เช่น A572D และ Q573E) ส่งผลกระทบต่อการทำงานของ sodium channel โดยพบในหลายกลุ่มอาการ นอกจากนี้ ตำแหน่ง S516 และ S594 ยังทำให้ sodium channel มีศักย์ไฟฟ้าเป็นลบมากขึ้น และเพิ่มจำนวน sodium channel ที่อยู่ในระยะ intermediate inactivation
3. Ubiquitination เกี่ยวข้องกับการ trafficking โดยควบคุมการสลายของโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะจับบริเวณ PY-motif ใน C-terminus และลดความหนาแน่นของ sodium channel บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์<sup>(34)</sup>

### Protein-protein interaction

โปรตีน SCN5A ทำงานร่วมกับโปรตีนอื่นๆ อีกหลายชนิด โดยมักจับบริเวณ C-terminus แบ่งกลุ่มตามหน้าที่ของโปรตีนได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

1. โปรตีนยึดเกาะ (anchoring/adaptor proteins) ซึ่งทำงานเกี่ยวข้องกับการ trafficking และชี้เป้าหมายของ channel protein ในบริเวณที่จำเพาะบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น MOG1
  2. เอนไซม์ที่ทำงานร่วมหรือดัดแปลงโครงสร้างของ channel เช่น protein kinases หรือ ubiquitin ligases (post-translational modifications)
  3. โปรตีนที่ควบคุมคุณสมบัติทางชีวภาพของ Nav1.5 ในการยึดจับ เช่น GPD1L<sup>(35)</sup>
- โปรตีนเหล่านี้ เป็นที่สนใจในการศึกษาหาการกลายพันธุ์ที่อาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น MOG1 และ GPD1L ในกลุ่มอาการ BrS

### 2.2.5 ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A และกลุ่มอาการต่างๆ

ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A มี 2 แบบ คือ gain-of-function และ loss-of-function โดยความแปรผันทางพันธุกรรมแบบ gain-of-function ส่งผลให้ประจุโซเดียมเข้าสู่เซลล์มากและเกิด inactivation ช้าลง ทำให้ action potential นานขึ้น มีการศึกษาพบว่ามีความ

เกี่ยวข้องกับ Long QT syndrome type 3 ส่วน loss-of-function เกิดจากการที่ sodium channel มีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป ประจุโซเดียมไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ตามปกติ เกิดการลดลงของกระแสของประจุโซเดียม มีการศึกษาพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับหลายโรค เช่น Brugada syndrome และ SUNDS<sup>(36)</sup>

### 1. Long QT syndrome (LQT)

Long QT syndrome เป็นกลุ่มอาการที่มีการเต้นของหัวใจผิดปกติ โดยมีกระแสของประจุโซเดียมเคลื่อนเข้าสู่เซลล์นานกว่าปกติ ทำให้ ventricular repolarization เกิดขึ้นช้าลง จึงทำให้เกิด Torsade de pointes และ ventricular fibrillation ได้ Long QT syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรมและมีการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ในตำแหน่งต่างๆ ร้อยละ 8 – 10 จากผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ LQT ทั้งหมดที่มีผลการตรวจทางพันธุกรรมเป็นบวก<sup>(11)</sup> เช่น

จากการศึกษาของ Wang Q และคณะ ในปีค.ศ. 1995 พบว่า polymorphisms ของยีน *SCN5A* มีความสัมพันธ์กับ LQT3 บน 3p21-24<sup>(37)</sup>

จากการศึกษาของ Keller D และคณะ ในปีค.ศ. 2003 พบ deletion ที่ตำแหน่ง delQKP 1507 – 1509<sup>(38)</sup>

### 2. Brugada syndrome

ในผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ Brugada syndrome พบการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ได้ประมาณร้อยละ 20 – 25 จากผู้ป่วยทั้งหมด<sup>(9)</sup>

จากการศึกษาของ Rook MB และคณะ ในปีค.ศ. 1999 พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R1512W และ A1924T บน exon 26 และ 28 ตามลำดับ<sup>(39)</sup>

จากการศึกษาของ Akai J และคณะ ในปีค.ศ. 2000 พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S1710L บน exon 28<sup>(40)</sup>

นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ศึกษาและค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ในผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ Brugada syndrome มากกว่า 300 ตำแหน่ง<sup>(41)</sup> ดังภาพที่ 5

สาเหตุที่การกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ทำให้เกิดกลุ่มอาการ Brugada syndrome มีหลายกลไก ได้แก่

1. การเปลี่ยนแปลงของ channel ทำให้กระแสของประจุโซเดียมลดลง
2. การเกิด stop codon ก่อนตำแหน่งหยุดจริง ทำให้ได้โปรตีนที่สั้นลงและไม่สามารถทำงานได้
3. โปรตีนที่มีการกลายพันธุ์อาจไม่สามารถออกจาก ER ได้ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน *SCN5A* ลดลงที่บริเวณ sarcolemma และส่งผลให้กระแสของประจุโซเดียมลดลง<sup>(42)</sup>



### 3. Cardiac Conduction Disease (CCD)

เป็นกลุ่มอาการความผิดปกติของการเดินของหัวใจที่เกิดขึ้นในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยพบ QRS complex กว้างขึ้นในการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ รวมทั้งมี left-bundle-branch block หรือ right-bundle-branch block ซึ่งสามารถรวมเป็น atrioventricular block ได้ ในปีค.ศ.1999 มีการศึกษาพบความเกี่ยวข้องของ CCD กับการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* เป็นครั้งแรก<sup>(31)</sup>

### 4. Sick Sinus Syndrome (SSS)

เป็นกลุ่มอาการความผิดปกติของการเดินของหัวใจที่เกิดขึ้นในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยมีลักษณะสำคัญคือ หัวใจเต้นช้าอย่างมาก (severe sinus bradycardia) ความผิดปกติของไซนัสโนด sinoatrial (SA) arrest และการเกิดกลุ่มอาการหัวใจเต้นเร็ว-หัวใจเต้นช้า (tachycardia – bradycardia syndrome) ในปีค.ศ. 2003 มีการศึกษาพบความเกี่ยวข้องของ SSS กับการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* เป็นครั้งแรก<sup>(11)</sup>

### 5. Dilated Cardiomyopathy (DCM)

เป็นกลุ่มอาการความผิดปกติของโครงสร้างของหัวใจ โดยพบห้องหัวใจขยายใหญ่ผิดปกติ ทำให้ไม่สามารถสูบฉีดเลือดได้และเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ กลไกการเกิดโรคที่สัมพันธ์กับความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* แบ่งได้เป็นหลายแบบ เนื่องจากพบทั้ง gain-of-function และ loss-of-function โดยสมมติฐานแรกคือโรค DCM ทำให้เกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะหรือความผิดปกติของการทำงานของ sinus node เนื่องจากหัวใจเต้นช้าทำให้เกิดการขยายขนาดขึ้น ส่วนสมมติฐานที่สองคือการเพิ่มขึ้นของ window current หรือการคงอยู่ของกระแสของประจุโซเดียม ส่งผลกระทบต่อประจุแคลเซียมและ pH ผ่านทางการแลกเปลี่ยนประจุของ  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ซึ่งไม่พบในกลุ่มอาการ LQT การรั่วไหลของโปรตอนจาก R225W, R222Q และ R219H ทำให้มีความเป็นกรดและกระตุ้นให้สร้างเซลล์เพิ่มขึ้น กลไกสุดท้าย เนื่องจากโปรตีน *SCN5A* ประกอบเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนบริเวณ intercalated disc ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ การรบกวนโปรตีนนี้จึงส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของหัวใจได้<sup>(31)</sup>

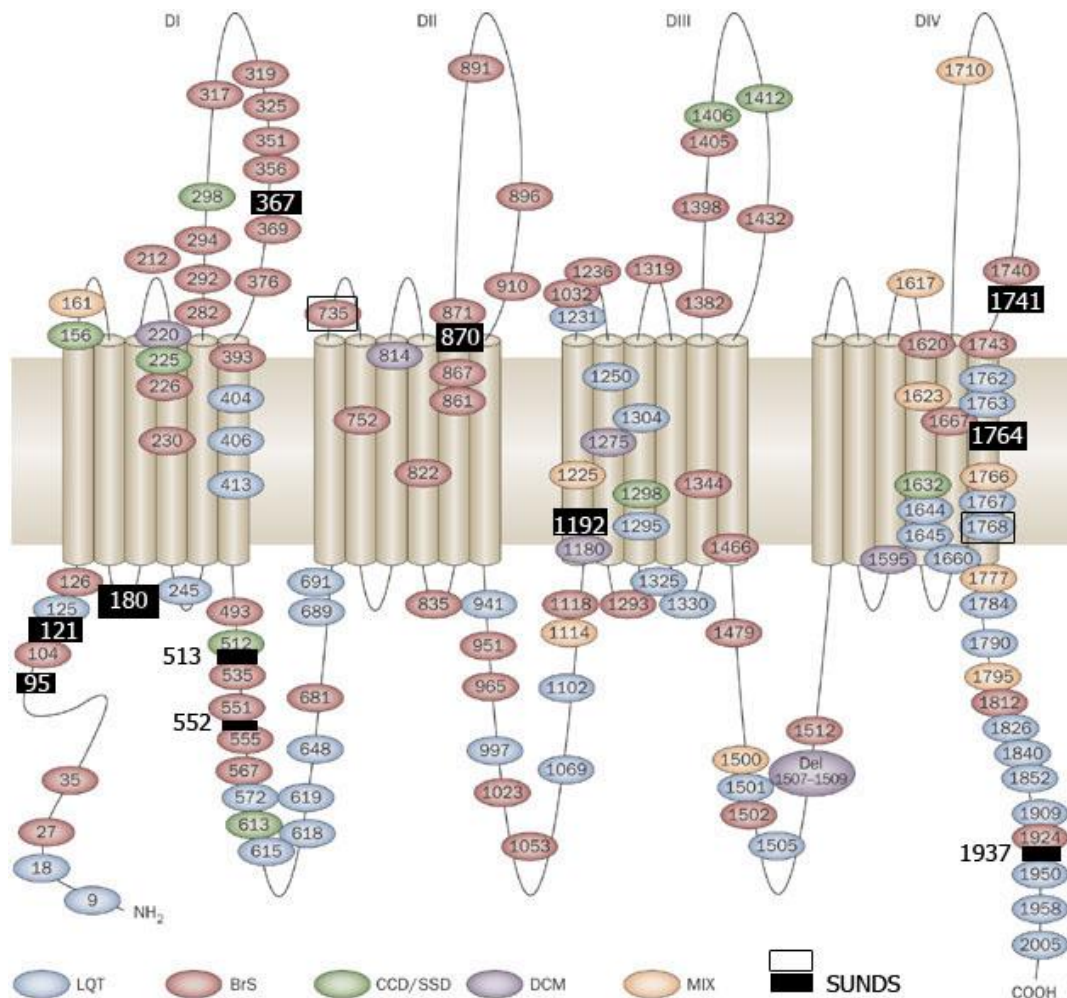
### 6. Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome (SUNDS)

การศึกษาก่อนหน้าที่พบความเกี่ยวข้องของกลุ่มอาการ SUNDS กับการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* โดยสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A ในกลุ่มอาการ SUNDS

|            |   |   |   |   |  |
|------------|---|---|---|---|--|
|            | Yanatsaneejit, 2001 <sup>(5)</sup>                          | Vatta et al., 2002 <sup>(6)</sup>                 | Cheng et al., 2011 <sup>(41)</sup>                        | Kaufenstein et al., 2013 <sup>(42)</sup>                              | Liu et al., 2014 <sup>(12)</sup>   |
| population | Thai  | Japanese + Thai                                   | Chinese Han   | German  | Chinese Han  |
| sample     | ผู้รอดชีวิตจากโศกตายนและครอบครัว-control                    | ผู้รอดชีวิตจากโศกตายนและครอบครัวจำนวน 10 ครอบครัว | SUNDS-control   | SUNDS 15 case   | SUNDS-control  |
| criteria   | ECG pattern, Family history                                 | ECG pattern, Family history                       | Male>17yrs., no relevant history, SUNDS, Autopsy negative | 1 – 40 yrs., alive 24 h before, no relevant history, Autopsy negative | 15 – 50 yrs., no relevant history, SUNDS, Autopsy negative, rule out other cause of death          |
| method     | Sequencing เฉพาะ exon 5, 12, 17, 18, 23, 28                 | SSPC or dHPLC, sequencing                         | Sequencing  | Targeted mutational analysis (PCR)                                    | Sequencing   |
| result     | polymorphism ที่ตำแหน่ง A180G ในexon 5 และ G552R ใน exon 12 | 3 mutations ที่ตำแหน่ง R367H, A735V และ R1192Q    | polymorphism ที่ตำแหน่ง C5457T ใน exon 28 และ 3666+69G>C  | 2 mutations ที่ตำแหน่ง D1741Y และ I1768V ใน exon 28                   | 7 mutations ที่ตำแหน่งV95I, R121Q และ R367H และ ตำแหน่งใหม่ ได้แก่ R513H, D870H, V1764D และ S1937F |

สรุปการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ที่ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งสัมพันธ์กับกลุ่มอาการ Long QT syndrome, Brugada syndrome, Cardiac Conduction Disease, Sick sinus node syndrome, Dilated Cardiomyopathy และ SUNDS แสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ที่ตำแหน่งต่างๆ ตามกลุ่มอาการ ดัดแปลงจาก <http://www.nature.com/nrcardio/journal/v6/n5/full/nrcardio.2009.44.html> และงานวิจัยที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *SCN5A* ในกลุ่มอาการ SUNDS<sup>(5, 6, 13, 14)</sup>

### 2.2.6 ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้ทั่วไปของยีน SCN5A (Common variants)

ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A สามารถพบได้ในประชากรทั่วไป โดยเฉพาะ single nucleotide polymorphisms (SNPs) จากการศึกษาด้าน genome wide association studies (GWAS) ในประชากรจำนวนมากเพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ ที่สัมพันธ์กับลักษณะของคลื่นไฟฟ้าหัวใจซึ่งอาจทำให้เกิดการเต้นของหัวใจผิดจังหวะ พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A/SCN10A มีความเกี่ยวข้องกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจชนิด QTc-interval, QRS duration และ PR-interval อีกทั้งยังสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจาก SUNDS ด้วย<sup>(36)</sup>

ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้ทั่วไปของยีน SCN5A ในชาวเอเชียตะวันออกคือ H558R และ R1193Q ซึ่งทั้งสองตำแหน่งมีค่า Allele frequency (AF) จากฐานข้อมูลของ ExAC (ในชาวเอเชียตะวันออก) เท่ากับ 0.10 และ 0.07 ตามลำดับ

### 2.3 การตรวจวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม

วิธีการตรวจวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมทำได้โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing) ซึ่งใช้สำหรับการหาความแปรผันทางพันธุกรรมตำแหน่งใหม่ โดยมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

1. Sanger sequencing ถูกคิดค้นขึ้นในปีค.ศ. 1977 มีหลักการพื้นฐานคือการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นทีละ 1 นิวคลีโอไทด์ โดยการต่อสายดีเอ็นเอด้วย Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ทีละตัวและใช้ Dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP) ซึ่งติดฉลาก ในการหยุดปฏิกิริยา จากนั้นแยกผลที่ได้ตามขนาด เดิมวิธีนี้ทำการวิเคราะห์โดยใช้ 4 หลอดทดลอง (แยกแต่ละเบส) ก่อนจะพัฒนามาใช้สี fluorescence (น้ำยา bigdye) ซึ่งสามารถวิเคราะห์รวมกันได้หลอดทดลองเดียว

2. Next generation sequencing (NGS) มีหลักการที่แตกต่างกันไปในแต่ละเครื่อง แต่มีขั้นตอนที่เหมือนกันคือ

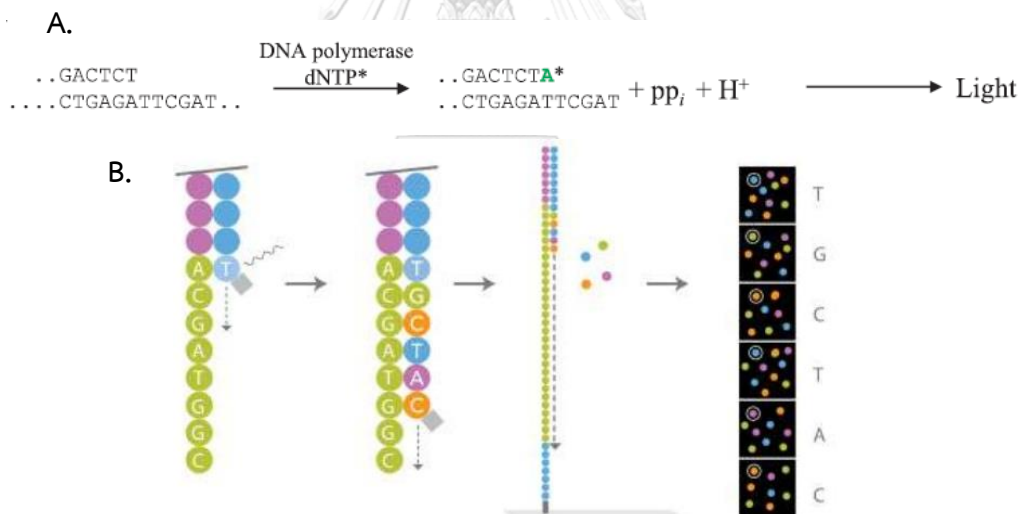
- a. การสร้าง library คือการต่อ adaptor ให้กับดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งดีเอ็นเอนั้นต้องเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ขนาด 100-800 bp และปลายทู่ (blunt end)
- b. surface-base amplification of library fragment มีการใช้เอนไซม์ และ solid support ที่จะเชื่อมต่อกับ adaptor ด้วยพันธะโคเวเลนต์ จากนั้นจึงเกิดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจนมีปริมาณมากพอที่จะตรวจวัดได้ ซึ่งข้อมูลที่วัดได้จะมาจากแต่ละโมเลกุลของ library ที่ถูกสร้างและแสดงถึงความถี่ที่พบลำดับเบสนี้ในตำแหน่งนั้นๆในแต่ละ library

ค่าที่ใช้ในวิธี Next generation sequencing คือ sequence coverage ซึ่งเป็นจำนวนของลำดับเบสที่อ่านได้ โดยจะแสดงผลเป็นค่า average value คือค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งที่อ่านต่อลำดับเบส เช่น 10x คือในตำแหน่งใดๆมีการอ่านผลลำดับเบสจากใน library เฉลี่ย 10 ครั้ง

ข้อดีของวิธี Next generation sequencing คือ

1. มีการอ่านผลซ้ำหลายครั้งในตำแหน่งเดียว เนื่องจากมีการอ่านผลในแต่ละโมเลกุลของ library
2. เป็นการอ่านผลการวิเคราะห์ลำดับเบสสายสั้นๆ ทำให้ไม่ยากต่อการแปลผลข้อมูล
3. ได้ข้อมูลที่อ่านจากทั้งสองสายของดีเอ็นเอในการทำครั้งเดียว เนื่องจากมี adaptor ต่อจากปลายทั้งสองข้างจึงมีการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้ง forward และ reverse

ในแต่ละเครื่องมีการใช้หลักการที่แตกต่างกันไปในการวิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น Illumina Miseq system ใช้หลักการ sequencing by synthesis (ดังภาพที่ 5) ซึ่งมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ dNTP ที่ถูกทำให้ไม่สามารถต่อสายได้ด้วย 3'-OH blocking group และติดฉลากด้วยสี fluorescence ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยกล้อง จากนั้น 3'-OH blocking group และสี fluorescence จะถูกกำจัดออกด้วยวิธีทางเคมี เพื่อให้ dNTP ตัวต่อไปสามารถมาต่อสายได้ (15, 43)



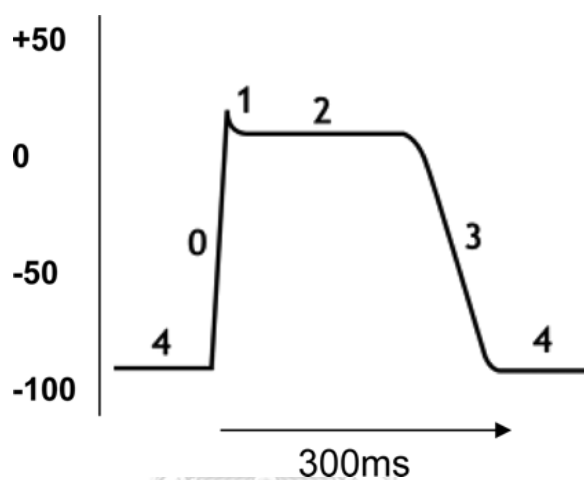
ภาพที่ 6 แสดงหลักการ sequencing by synthesis ของ Illumina Miseq system

ที่มา : A. Borsting, C. and Morling, N.(2015)<sup>(15)</sup>

B. <http://www.slideshare.net/mkim8/a-comparison-of-ngs-platforms>

## 2.4 คุณสมบัติทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ

ในสภาวะปกติ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะมีประจุโซเดียมมากภายในเซลล์และประจุโพแทสเซียมมากภายนอกเซลล์ โดยภายนอกเซลล์จะมีประจุบวกมากกว่า เรียกภาวะนี้ว่า polarization เมื่อ mechanical cells ได้รับกระแสไฟฟ้าจะกระตุ้นให้เกิด depolarization<sup>(44)</sup> การเคลื่อนที่ของประจุเข้า-ออกจากเซลล์ส่งผลให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ เรียกว่า action potential ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดง action potential ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ที่มา : <http://ceaccp.oxfordjournals.org/content/7/3/85/F2.expansion>

ระยะ 0 depolarization เป็นระยะที่ sodium channel เปิดออก ประจุโซเดียมเคลื่อนเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอย่างรวดเร็ว ความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) ของประจุโพแทสเซียมในการเคลื่อนที่ออกจากเซลล์ก็ลดลง ความต่างศักย์ไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจเปลี่ยนจาก -90 mV ไปเป็น +10 mV

ระยะ 1 partial repolarization เป็นระยะที่ sodium channel ปิด ความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของประจุโซเดียมลดลง

ระยะ 2 plateau phase เป็นระยะที่ประจุแคลเซียมเคลื่อนที่ออกจากเซลล์ผ่าน calcium channels ประจุโซเดียมเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์โดยแลกเปลี่ยนกับประจุแคลเซียมที่เคลื่อนออกจากเซลล์ (sodium-calcium exchanger)  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^+$

ระยะ 3 repolarization เป็นระยะที่ sodium channel และ calcium channel ปิด

ระยะ 4 resting membrane potential ระยะพัก ความต่างศักย์ไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจกลับสู่ -90 mV ซึ่งเป็นผลมาจากประจุโซเดียมเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์โดยแลกเปลี่ยนกับประจุโปแตสเซียม ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump)  $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$

การที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมี action potential ยาวถึง 300 ms นั้น ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจไม่เกิด action potential ก่อนที่ระยะ repolarization จะสิ้นสุดลง ซึ่งช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการชักกระตุก (tetany)<sup>(45)</sup>

## 2.5 ความแปรผันทางพันธุกรรม (Variation)

Human Genome Variation Society (HGVS) ให้คำนิยามของการแปรผันทางพันธุกรรม (variant) ไว้ว่า “ความแตกต่างระหว่างลำดับเบสอ้างอิงและลำดับเบสตัวอย่าง” (a difference between the reference sequence and the sample sequence) โดยใช้เรียกรวมๆ แทนคำว่า mutation และ polymorphism ที่มีอยู่เดิม เนื่องจากการแยกระหว่างทั้งสองคำนี้มีความไม่แน่ชัดอยู่มากโดยเฉพาะในแง่ของการก่อโรค

ชนิดของการแปรผันทางพันธุกรรมที่สำคัญ สามารถแบ่งแยกได้ตามระดับ ดังนี้  
ระดับดีเอ็นเอ

1. การแทนที่ของลำดับเบส (Substitution variant) คือการที่ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง โดยเปลี่ยนจากนิวคลีโอไทด์หนึ่งเป็นอีกตัวหนึ่ง
2. การเพิ่มขึ้นของลำดับเบส (insertion variant) คือการที่ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง โดยเกิดจากการที่มีนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัวหรือมากกว่าแทรกเข้ามาเพิ่ม
3. การลดลงของลำดับเบส (deletion variant) คือการที่ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง โดยเกิดจากการที่มีนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัวหรือมากกว่าหายไป

ระดับโปรตีน

1. Frameshift variant การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสระหว่างจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน และจุดหยุดการสังเคราะห์ซึ่งเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงแล้ว ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเคลื่อนไป ใช้สัญลักษณ์ fs
2. Stop gained variant การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเป็นจุดหยุดการสังเคราะห์ซึ่งเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงแล้ว ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนหยุดลง ใช้สัญลักษณ์ \* หรือ X หรือ Ter
3. Missense variant การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงแล้ว ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์เปลี่ยนแปลงไปเฉพาะในตำแหน่งนั้น<sup>(46)</sup>

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัย Analytical (Case-control study)

#### 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population) คือคนไทยที่เสียชีวิตโดยไม่ทราบสาเหตุ

#### 3.3 การคัดเลือกตัวอย่าง

##### 3.3.1 กลุ่มผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDs

เกณฑ์การวินิจฉัยการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDs

1. ประวัติของผู้เสียชีวิต ไม่มีโรคประจำตัว เสียชีวิตอย่างกะทันหันโดยไม่ทราบเหตุ (ภายใน 24 ชั่วโมง)
2. การชันสูตรพลิกศพ การตรวจร่างกายภายนอก การผ่าชันสูตร การตรวจทางพยาธิวิทยาและการตรวจทางนิติพิษวิทยา ไม่พบสาเหตุการเสียชีวิตอื่น โดย Autopsy and microscopic findings follow Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death ของ Basso, C., et al. (2008)<sup>(23)</sup> exclude death by common intoxication (alcohol, drug addicts: methamphetamine, morphine groups) สถานที่ตรวจทางพยาธิวิทยา ณ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และอ่านผลการตรวจขึ้นเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ 2 ครั้ง คืออ่านผลโดยแพทย์นิติเวชผู้ทำการผ่าชันสูตร และอ่านผลซ้ำโดยคณะผู้วิจัย (รศ.นพ. กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน) โดยเก็บ specimen จากผู้เสียชีวิตที่เข้ามาในภาควิชานิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกเข้า (Inclusion criteria):

1. เชื้อชาติไทย
2. อายุระหว่าง 20-49 ปี

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria):

1. ศพที่เสียชีวิตเกินกว่า 12 ชม. โดยการประเมินจากแพทย์นิติเวช และแพทย์ประจำบ้าน (ให้แพทย์นิติเวชตรวจสอบซ้ำ)
2. มีประวัติโรคประจำตัวโดยเฉพาะกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด กลุ่มโรคไต



### เก็บตัวอย่าง

1. การเก็บสิ่งตัวอย่างไปข้างหน้า เก็บ peripheral blood ปริมาณ 10 mL เก็บในหลอดทดลอง ควรเก็บสิ่งตัวอย่างและปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บ Buffy coat ทันทีหรือภายใน 12 ชม. หลังได้รับศพ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$
2. การเก็บสิ่งตัวอย่างย้อนหลัง เก็บ FTA blood เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
3. เก็บข้อมูลโดยแบบสอบถาม: ภูมิลำเนา, ประวัติบุคคลในครอบครัวเสียชีวิตอย่างเฉียบพลัน โดยไม่ทราบสาเหตุ

3.3.2 กลุ่มควบคุม (Control healthy) อาสาสมัครสุขภาพดีที่ได้ผ่านการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจทุกคน  
เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria):

1. เชื้อชาติไทย
2. อายุระหว่าง 20-49 ปี

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria):

1. มีประวัติโรคประจำตัวโดยเฉพาะกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด กลุ่มโรคไต
2. ตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบ Brugada pattern

เก็บตัวอย่าง peripheral blood ปริมาณ 10 mL ใน EDTA tube เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  และนำไปหยดใส่ FTA card เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย COA No.943/2016, IRB No. 447/59

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 3.4 ขนาดตัวอย่าง

คำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม PS: Power and Sample Size Calculation version

3.1.2 ของ Vanderbilt University ดังภาพที่ 8 ซึ่งคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$n/gr = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 P(1 - P)}{(p_1 - p_0)^2}$$

$n/gr$  = จำนวนประชากรตัวอย่างต่อกลุ่ม

$\alpha$  = ความน่าจะเป็นในการเกิด type I error ผู้วิจัยกำหนด ณ ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้น ค่า

$Z_{\alpha/2}$  จากการเปิดตาราง two-tailed = 1.96

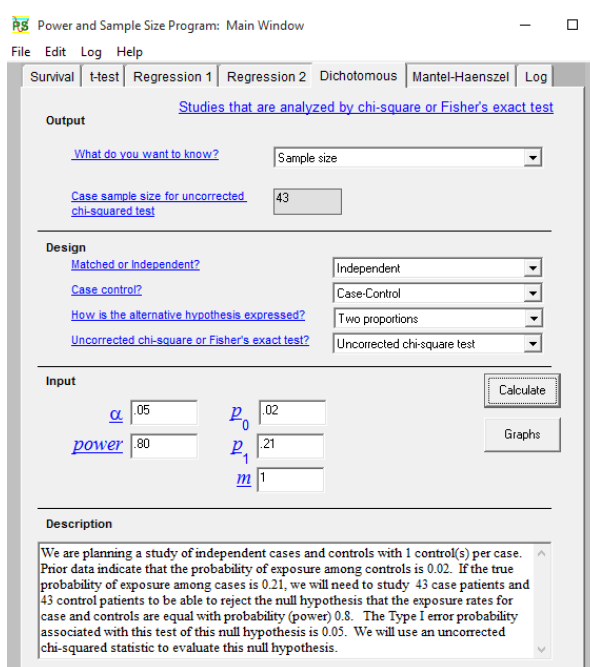
$\beta$  = ความน่าจะเป็นในการเกิด type II error ผู้วิจัยกำหนดความคลาดเคลื่อน 5 % หรือ  $\beta = 0.2$   
(ดังนั้น Power =  $1 - \beta = 80\%$ ) ค่า  $Z_\beta$  จากการเปิดตาราง = 0.84

$p_0$  = สัดส่วนของลักษณะที่สนใจที่พบในประชากรกลุ่ม control

$p_1$  = สัดส่วนของลักษณะที่สนใจที่พบในประชากรกลุ่ม case

จากงานวิจัยของ Kapplinger JD และคณะ ปีค.ศ. 2010 ระบุว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน SCN5A พบได้ประมาณร้อยละ 21 จากผู้ป่วย Brugada syndrome ( $p_1 = 0.21$ ) และพบในประชากรปกติประมาณร้อยละ 2-5 ( $p_0 = 0.02$ )<sup>(47)</sup>

$$P = (p_0 + p_1)/2 = (0.02 + 0.21)/2 = 0.115$$



ภาพที่ 8 แสดงการคำนวณขนาดตัวอย่างจากโปรแกรม PS

ดังนั้น ต้องใช้ขนาดของประชากรตัวอย่าง SUNDS case 43 คนและ control 43 คน

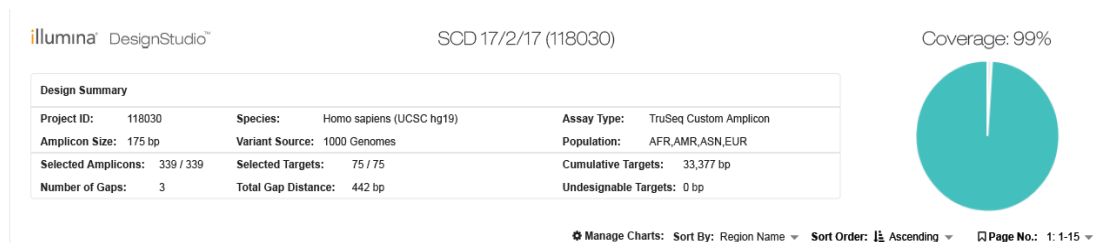
### 3.5 ขั้นตอนการวิจัย

การวิจัยแบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ การวิจัยเบื้องต้น (14 ตัวอย่าง) และการวิจัย 86 ตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนเหมือนกัน ดังนี้

#### 3.5.1 การออกแบบชุดตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส

การออกแบบชุดตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A สำหรับ TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep kit ด้วยโปรแกรม DesignStudio ของ Illumina

โดยกำหนดสปีชีส์ Homo sapiens (UCSC hg19) วิเคราะห์แบบ Single end และมีขนาดของ Amplicon 175 bp เนื่องจากตัวอย่างมีความเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอสูง ผลการออกแบบดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ข้อมูลการออกแบบชุดตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม DesignStudio

### 3.5.2 การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ

#### 1. การ purify ตัวอย่าง FTA

- punch ตัวอย่างขนาด 1.2 mm ตัวอย่างละ 10 ชิ้น ลงใน micro-centrifuge tube
- ใส่ FTA purification 150 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำออก ทำซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง
- ใส่ TE buffer 200 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งสุดท้าย Air-dry ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสจนกว่า FTA punch จะแห้งสนิท

#### 2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNA IQ™ System-Database ซึ่งอาศัยหลักการของการทำให้เซลล์แตก และใช้ resin ที่ติดประจุบวกไปจับกับสายดีเอ็นเอที่มีประจุเป็นลบ จากนั้นใช้แรงแม่เหล็กดูด resin ที่มีสายดีเอ็นเอติดอยู่ไว้ และทำการล้างส่วนประกอบอื่นๆทิ้ง แล้วจึง elude ดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจาก resin ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอมีดังนี้

- เตรียม lysis buffer โดยผสม lysis buffer 250 ไมโครลิตรกับ 1M DTT 2.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง
- ใส่ lysis buffer ที่เตรียมไว้ 150 ไมโครลิตรลงในแต่ละตัวอย่าง incubate ที่ 70°C 30 นาที ย้ายส่วนน้ำไปใส่ tube ใหม่
- ใส่ resin 7 ไมโครลิตร (ผสมให้ resin เข้ากันดีก่อน) ลงในแต่ละตัวอย่าง ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที (vortex 2-3 วินาที ทุกๆ 1 นาที) แล้ววางบน magnetic stand และดูดส่วนน้ำทิ้ง
- ใส่ Lysis Buffer ที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละตัวอย่าง วางบน magnetic stand ดูดส่วนน้ำทิ้ง

- e. ล้างอีก 3 ครั้งด้วย 1X Wash Buffer 100 ไมโครลิตร แล้ววางบน magnetic stand และดูดส่วนน้ำทิ้ง ครึ่งสุดท้ายควรดูดน้ำออกให้หมด
- f. เปิดฝา Air-dry ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
- g. ใส่ Elution Buffer 40 ไมโครลิตร incubate ที่ 65°C 5 นาที
- h. วางบน magnetic stand และดูดส่วนน้ำซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ไปยัง tube ใหม่

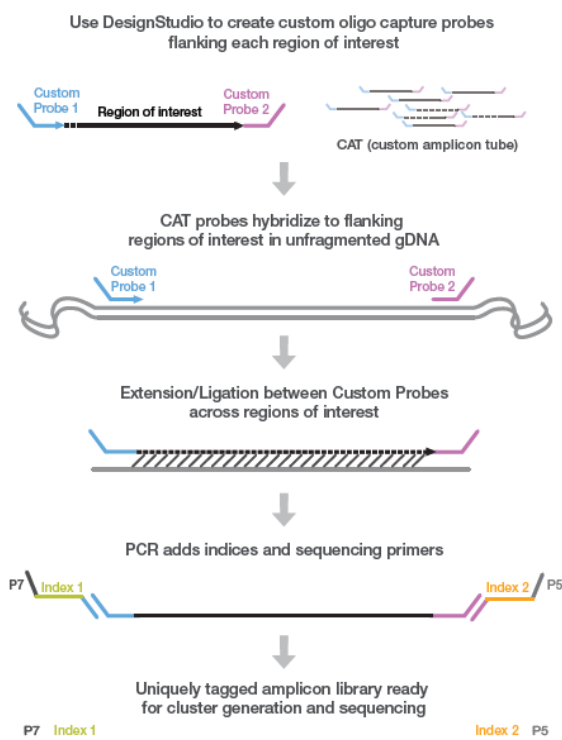
### 3.5.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit ซึ่งเป็นการวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ probe ซึ่งจับกับดีเอ็นเออย่างจำเพาะและติดฉลากด้วยสี fluorescence แล้วทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณด้วยเครื่อง Real-time PCR (Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR system) โดยเทียบกับ Standard curve

- a. การเตรียม standard โดยทำการเจือจางจาก 200 ng/μl stock เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ standard 50.0, 16.7, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21, 0.068 และ 0.023 ng/μl ตามลำดับ
- b. การเตรียม master mix ต่อ 1 reaction  
Quantifiler Human Primer mix 10.5 ไมโครลิตร  
Quantifiler PCR Reaction mix 12.5 ไมโครลิตร
- c. ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างละ 2 ครั้ง ใช้ปริมาณตัวอย่างๆ ละ 2 ไมโครลิตรต่อ 1 ครั้ง  
Thermo cycler condition  
Step 1 95 °C 10 นาที  
Step 2 จาก 95 °C ค่อยๆ ลดลงจนถึง 60 °C 40 นาที
- d. นำผลปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย
- e. เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้มีค่าต่ำ บางตัวอย่างจึงต้องทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ความร้อนเพื่อให้ น้ำระเหยออกแล้วทำการเติมน้ำให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

### 3.5.4 การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Next-Generation Sequencing

1. การเตรียม library ด้วย TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep kit มีขั้นตอนดังภาพที่ 10



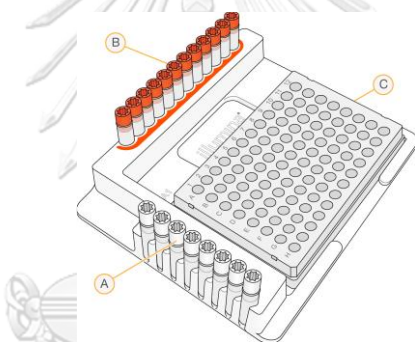
ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการเตรียม library ของ TruSeq Custom Amplicon

- a. Quantify and Dilute DNA เพื่อให้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นมีความเข้มข้นเหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ มีขั้นตอนดังนี้
  1. เจือจางปริมาณดีเอ็นเอด้วย Resuspension Solution 1 (RS1) ใน microcentrifuge tube ให้มีปริมาตรสุดท้าย 4 ไมโครลิตร
  2. เติม Sample Stabilization Solution 1 (SS1) 1 ไมโครลิตร สำหรับทุกๆ ตัวอย่าง (ให้มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 10-25 ng)
  
- b. Hybridize Oligo Pool เป็นขั้นตอนที่ oligo pool ที่ประกอบด้วย upstream oligos และ downstream oligos ซึ่งจำเพาะต่อยีน *SCN5A* จะไปจับกับดีเอ็นเอของตัวอย่าง มีขั้นตอนดังนี้
  1. เจือจาง Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) 2.5 ไมโครลิตรด้วย RS1 2.5 ไมโครลิตรต่อจำนวนตัวอย่าง
  2. เจือจาง Control Oligo Pool (ACP3) 2.5 ไมโครลิตรด้วย RS1 2.5 ไมโครลิตร (สำหรับ control)

3. เจือจาง Control DNA 2800M (2800M) 2 ไมโครลิตรด้วย RS1 2 ไมโครลิตรและ SS1 1 ไมโครลิตร (สำหรับ positive control)
  4. ใส่ 2800M ที่เจือจางแล้ว ลงในหลุมหนึ่งของเพลท 5 ไมโครลิตร และเติม ACP3 ที่เจือจางแล้ว 5 ไมโครลิตรลงไป เพื่อเป็น positive control
  5. ใส่ RS1 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมหนึ่งเพื่อเป็น negative control
  6. ใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (จากขั้นตอนที่ 1) แต่ละตัวอย่างลงในหลุมแต่ละหลุมของเพลท ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร
  7. เติม CAT ที่เจือจางแล้ว 5 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม ยกเว้นหลุมที่มี 2800M
  8. เติม Oligo Hybridization for Sequencing 2 (OHS2) ที่เจือจางแล้ว 15 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม ปิดฝาดังกล่าวเพื่อผสมให้เข้ากัน
  9. ถ้ามีฟอง ให้ปั่นเพลทที่  $100 \times g$  20 วินาที
  10. นำไปใส่ใน thermal cycler ตั้งโปรแกรม ดังนี้  
 Preheat lid  $100^{\circ}\text{C}$   
 Step 1:  $95^{\circ}\text{C}$  3 นาที  
 Step 2: จาก  $90^{\circ}\text{C}$  ลดลงทีละ  $0.5^{\circ}\text{C}$  ค้างไว้ 30 วินาที ตั้ง ramp ที่  $0.1^{\circ}\text{C}$  ต่อวินาที  
 Step 3: ทำ step 2 ซ้ำจำนวน 59 รอบ  
 Step 4: จาก  $60^{\circ}\text{C}$  ลดลงทีละ  $0.5^{\circ}\text{C}$  ค้างไว้ 1 นาที ตั้ง ramp ที่  $0.1^{\circ}\text{C}$  ต่อวินาที  
 Step 5: ทำ step 4 ซ้ำจำนวน 19 รอบ  
 Step 6: จาก  $50^{\circ}\text{C}$  ลดลงทีละ  $1^{\circ}\text{C}$  ค้างไว้ 2 นาที ตั้ง ramp ที่  $0.1^{\circ}\text{C}$  ต่อวินาที  
 Step 7: ทำ step 6 ซ้ำจำนวน 9 รอบ  
 Step 8: จาก  $40^{\circ}\text{C}$  ค้างไว้ 10 นาที ตั้ง ramp ที่  $0.1^{\circ}\text{C}$  ต่อวินาที
  11. ผสม Extension-Ligation Enzyme (ELE) และ Extension-Ligation Buffer (ELB) เตรียมไว้สำหรับขั้นตอนต่อไป  
 สำหรับการวิจัยเบื้องต้นใส่ ELE 18 ไมโครลิตร ลงใน ELB tube  
 สำหรับการวิจัย 86 ตัวอย่างใส่ ELE 137 ไมโครลิตร ลงใน ELB tube
  12. ผสมโดยการกลับหลอดไปมา ห้าม vortex
  13. นำหลอด ELB/ELE ที่ผสมรวมกันวางบนน้ำแข็ง
- c. Remove Unbound Oligos เป็นขั้นตอนที่กำจัด unbound oligos จาก genomic DNA โดยใช้ตัวกรองขนาด แล้วจึงล้าง unbound oligos ออก มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม Sample Purification Beads (SPB) 25 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม ปิเปตต์ซ้ำๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
  2. incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
  3. วางบน magnetic stand รอจนกระทั่งสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที)
  4. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
  5. ล้าง beads 3 ครั้ง ตามขั้นตอน ดังนี้
  6. เติม Stringent Wash 1 (SW1) 80 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
  7. incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 วินาที
  8. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
  9. ในการล้างครั้งสุดท้ายใช้ปิเปตต์ขนาด 20 ไมโครลิตร ดูด SW1 ออกให้หมด
  10. เติม 60% EtOH 80 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
  11. incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 วินาที
  12. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
  13. ในการดูดน้ำครั้งสุดท้ายใช้ปิเปตต์ขนาด 20 ไมโครลิตร ดูด EtOH ออกให้หมด
  14. Air-dry ได้มากที่สุด 5 นาที
- d. Extend and Ligate Bound Oligos เป็นการเชื่อม hybridized upstream และ downstream oligos โดย DNA polymerase จะต่อสายดีเอ็นเอจาก upstream oligo ไปยัง targeted region และ ligation กับปลาย 5' ของ downstream oligo โดยใช้ DNA ligase ได้ผลเป็น oligo ที่มี target region อยู่ตรงกลางขนาดด้วยลำดับเบสที่จำเป็นต่อการ amplification มีขั้นตอนดังนี้
1. เอาเพลทออกจาก magnetic stand
  2. เติม ELB/ELE ที่ผสมไว้ ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 22 ไมโครลิตร ปิเปตต์ซ้ำๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
  3. ถ้ามีฟอง ให้ปั่นเพลทที่ 100 × g 20 วินาที
  4. นำไปใส่ใน thermal cycler ตั้งโปรแกรม ดังนี้
    - Preheat lid 100°C
    - Step 1 37°C 45 นาที
    - Step 2 70°C 20 นาที
    - Hold ที่ 4°C

5. ผสม Enhanced DNA Polymerase (EDP) และ Enhanced Master Mix (EMM) เตรียมไว้สำหรับขั้นตอนต่อไป ใน LoBind microcentrifuge tube  
สำหรับการวิจัยเบื้องต้น ผสม EDP 17.6 ไมโครลิตร กับ EMM 334 ไมโครลิตร  
สำหรับการวิจัย 86 ตัวอย่าง ผสม EDP 106 ไมโครลิตร กับ EMM 2006 ไมโครลิตร
  6. นำหลอด EDP/EMM ที่ผสมรวมกันวางบนน้ำแข็ง
- e. Amplify Libraries เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวน products ที่ได้จากขั้นตอนก่อนและต่อ index 1 (i7) adapters, index 2(i5) adapters และลำดับเบสที่จำเป็นต่อการสร้าง cluster ในการวิเคราะห์ มีขั้นตอนดังนี้
1. วาง Index 1 (i7) adapters ลงในคอลัมน์ที่ 1–12 ของ TruSeq Index Plate Fixture
  2. วาง Index 2 (i5) adapters ลงในแถวที่ A–H ของ TruSeq Index Plate Fixture
  3. วางเพลทลงบน TruSeq Index Plate Fixture ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 TruSeq Index Plate Fixture

A Rows A–H: Index 2 (i5) adapters (white caps), B Columns 1–12: Index 1 (i7) adapters (orange caps), C plate

4. ใส่ Index 1 (i7) adapter 4 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมตามแนวคอลัมน์ที่ 1–12 (เปลี่ยนฝาเมื่อเสร็จ)
5. ใส่ Index 2 (i5) adapter 4 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมตามแนวแถวที่ A–H (เปลี่ยนฝาเมื่อเสร็จ)
6. วางเพลทลงบนน้ำแข็ง
7. เติม EDP/EMM ที่ผสมไว้ ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร ปิดฝาดังเดิม เพื่อให้เข้ากัน
8. ปั่นเพลทที่ 280 × g 1 นาที
9. วางเพลทลงบนน้ำแข็ง



10. นำไปใส่ใน thermal cycler ตั้งโปรแกรม PCR ดังนี้

95°C 3 นาที

30 รอบของ:

98°C 20 วินาที

67°C 20 วินาที

72°C 40 วินาที

72°C 1 นาที

Hold ที่ 10°C

f. Clean Up Libraries ใช้ AMPure XP beads ในการ purify PCR products มีขั้นตอนดังนี้

1. ปั่น pellets ที่ 280 × g 1 นาที
2. ดูดสารละลายจากแต่ละหลุม 45 ไมโครลิตร ใส่ใน pellet ใหม่ พยายามอย่าให้ bead ติดมาด้วย
3. เติม SPB 36 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
4. เขย่าที่ 1800 rpm 2 นาที
5. incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
6. ปั่น pellets ที่ 280 × g 1 นาที
7. วางบน magnetic stand รอจนกระทั่งสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที)
8. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
9. ล้าง 2 ครั้ง ตามขั้นตอน ดังนี้
10. เติม 80% EtOH ที่เตรียมใหม่ๆ 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
11. incubate ที่บน magnetic stand 30 วินาที
12. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
13. ในการล้างครั้งสุดท้ายใช้ pipette ขนาด 20 ไมโครลิตร ดูด EtOH ออกให้หมด
14. เอา pellet ออกจาก magnetic stand และ air-dry 5 นาที
15. เติม RSB 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
16. เขย่าที่ 1800 rpm 2 นาที (bead ต้องละลายจนหมด)
17. incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
18. ปั่น pellets ที่ 280 × g 1 นาที
19. วางบน magnetic stand รอจนกระทั่งสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที)
20. ดูด purified library จากแต่ละหลุม 20 ไมโครลิตร ใส่ใน pellet ใหม่

21. ส่วนน้ำที่เหลืออยู่ในเพลทเดิมให้นำแบ่งมา 5 ไมโครลิตร เพื่อทำ Electrophoresis บน 4% agarose gel (ขนาดของ PCR Product มีค่าประมาณ 310 bp)
- g. Normalize Libraries เป็นการ normalize ความเข้มข้นของแต่ละ library เพื่อให้มีความสมดุลของการเพิ่มจำนวนของแต่ละตัวอย่างในการวิเคราะห์ มีขั้นตอนดังนี้
1. ใส่ Library Normalization Additives 1 (LNA1) ปริมาตร 44 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร
  2. ใช้ปิเปตต์ขนาด 1000 ไมโครลิตรผสม Library Normalization Beads 1 (LNB1) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
  3. เติม LNB1 ปริมาตร 8 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี LNA1 อยู่ กลับหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน
  4. ใส่ LNA1/LNB1 ที่ผสมไว้ ลงในแต่ละหลุมของเพลทที่มี library ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อยู่ หลุมละ 45 ไมโครลิตร
  5. เขย่าที่ 1800 rpm 30 นาที (ไม่ควรทิ้งไว้นานกว่านั้น)
  6. วางบน magnetic stand รอจนกระทั่งสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที)
  7. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
  8. เอาเพลทออกจาก magnetic stand
  9. ล้าง 2 ครั้ง ตามขั้นตอน ดังนี้
  10. เติม Library Normalization Wash 1 (LNW1) 45 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
  11. เขย่าที่ 1800 rpm 5 นาที
  12. วางบน magnetic stand รอจนกระทั่งสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที)
  13. ดูดน้ำในทุกหลุมทิ้ง
  14. ในการล้างครั้งสุดท้ายใช้ปิเปตต์ขนาด 20 ไมโครลิตร ดูด LNW1 ออกให้หมด
  15. เอาเพลทออกจาก magnetic stand
  16. เติม 0.1 N NaOH ที่เตรียมใหม่ๆ ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 30 ไมโครลิตร
  17. เขย่าที่ 1800 rpm 5 นาที (bead ต้องละลายจนหมด)
  18. วางบน magnetic stand รอจนกระทั่งสารละลายใส (ประมาณ 2 นาที)
  19. ระหว่างที่รอ ใส่ Library Normalization Storage buffer 2 (LNS2 30) ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของเพลทใหม่
  20. ดูดสารละลายจากเพลทเดิม 30 ไมโครลิตรของแต่ละหลุมไปยังเพลทใหม่ที่มี LNS2 อยู่
  21. ปั่นเพลทที่ 1000 × g 1 นาที

- h. Pool Libraries เป็นการรวมแต่ละ normalized libraries ลงในหลอดเดียว มีขั้นตอนดังนี้
1. ปั่นเพลทที่  $1000 \times g$  1 นาที
  2. คูดแต่ละ library มา 5 ไมโครลิตร ใส่รวมกันในหลอดเดียว ปิดเตตให้เข้ากันดี
- i. Denature and dilute pooled libraries การแยกสายดีเอ็นเอและเจือจางเพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นตามที่ต้องการก่อนนำไปวิเคราะห์ ใช้วิธี bead-based normalization method มีขั้นตอนดังนี้
1. เจือจาง pooled libraries โดยผสม pooled libraries 6 ไมโครลิตรกับ HYB buffer 594 ไมโครลิตร ใน microcentrifuge tube แล้ว vortex ให้เข้ากัน ปั่นที่  $280 \times g$  เป็นเวลา 1 นาที
  2. แยกสายดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนดังนี้
    - a. วาง tube บน incubator ที่  $98^{\circ}\text{C}$  2 นาที
    - b. ครบเวลาแล้ววางบนน้ำแข็งทันที
    - c. ทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 5 นาที
  3. การแยกสายดีเอ็นเอและเจือจาง PhiX control
    - a. เจือจาง PhiX ให้เป็น 4 nM โดยผสม 10 nM PhiX 2 ไมโครลิตรกับ RSB 3 ไมโครลิตร
    - b. แยกสายดีเอ็นเอของ PhiX โดยผสม 4 nM PhiX 5 ไมโครลิตรกับ 0.2 N NaOH 5 ไมโครลิตร แล้ว vortex ให้เข้ากัน ปั่นที่  $280 \times g$ , 1 นาที จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
  4. เจือจาง denatured PhiX ให้เป็น 20 nM โดยผสม denatured PhiX 10 ไมโครลิตรกับ HYB buffer 990 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน
  5. เจือจาง denatured PhiX ให้เป็น 12.5 nM โดยผสม 20 nM denatured PhiX 375 ไมโครลิตรกับ HYB buffer 225 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน
  6. ผสม libraries กับ PhiX control ที่เตรียมไว้เข้าด้วยกัน โดยผสม PhiX control 6 ไมโครลิตรกับ libraries (ที่เตรียมไว้จากข้อ 2) 594 ไมโครลิตร
  7. วางบนน้ำแข็งจนกว่าจะใส่ใน reagent cartridge

2. การวิเคราะห์ลำดับเบส สำหรับการวิจัยเบื้องต้นใช้ชุดน้ำยา MiSeq Reagent Micro kit v2 (300-cycle) ส่วนการวิจัย 86 ตัวอย่างใช้ชุดน้ำยา MiSeq Reagent kit v2 (300-cycle) วิเคราะห์แบบ

2 x 150 bps read length บนเครื่อง Illumina Miseq system ใช้หลักการ sequence by synthesis โดยการใช้ dNTP ที่ติดฉลากด้วย fluorescence และ 3'-OH blocking group เมื่อเกิดการต่อสายและตรวจจับด้วยกล้องแล้วฉลากที่ติดอยู่จะถูกกำจัดออกไปเพื่อให้ dNTP ตัวต่อไปสามารถเข้ามาต่อได้ โดยเกิดปฏิกิริยาซ้ำๆ จนอ่านลำดับเบสได้ทั้งสาย

### 3.5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. การวิเคราะห์คุณภาพของข้อมูล

ข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับเบสจะได้ผลออกมาในรูปแบบของ FASTQ file โดยข้อมูลที่ได้จะถูกตัดลำดับเบสที่เป็น adaptor ออกไปแล้ว การวิเคราะห์คุณภาพของข้อมูลจะใช้เบราว์เซอร์ชื่อว่า Galaxy<sup>(48)</sup> ซึ่งเว็บเบส (Web-base) ที่ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ขั้นตอนการวิเคราะห์มีดังนี้

- a. ไปที่ Get Data -> Upload file ที่ต้องการวิเคราะห์ (FASTQ file)
- b. ไปที่ NGS: QC and manipulation -> FASTQC (เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพของข้อมูลในแต่ละ FASTQ file) -> เลือก FASTQ ที่ต้องการวิเคราะห์

#### 2. การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาลำดับเบสที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมบนยีน SCN5A

- a. ถ้า per base quality มีค่า low หรือ fail -> Trimmomatic (Trim base program สำหรับ Illumina) โดยตัดลำดับเบสที่มี Quality ต่ำออก (สำหรับ Single end process วิเคราะห์เฉพาะ Read 1) โดยกำหนดค่า ดังนี้
  - Perform initial ILLUMINACLIP step? -> Yes
  - SLIDINGWINDOW: Perform a sliding window trimming, cutting once the average quality within the window falls below a threshold
  - Number of bases to average across 4
  - Average quality required 20
  - MINLEN: drop reads below a read length -> 30
- b. ทำการวิเคราะห์ FASTQC ซ้ำอีกครั้ง
- c. เปรียบเทียบกับ reference genome ด้วย NGS: Mapping -> map with BWA-MEM (>100bp) โดยกำหนดค่า ดังนี้
  - Use a built in index, Homo sapiens (b37) hg19\_g1k\_v37

- Single-end, Common use, default setting, Read group: Auto-assign-> yes  
(For merge process)
- d. รวมกลุ่มข้อมูลเป็นไฟล์เดียว ด้วย NGS: Picard -> MergeSamFiles (divide by group as in Illumina) use default setting
- e. NGS: Picard -> MarkDuplicate (If true do not write to output: Yes)
- f. วิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรม ด้วย NGS: Variant Analysis -> Freebayes โดยกำหนดค่า ดังนี้
  - Local ref -> Homo sapiens (b37) hg19\_g1k\_v37
  - Run individual
  - Limit to region: 3: 38589553-38691164 (Chr37.p13, NM198056.2)
  - Simple diploid with filter and coverage  
(minmapQuality30, minBaseQuality20) -> min coverage 10
- g. NGS: Variant Manipulation -> VcfAllelePrimitives โดยกำหนดค่า ดังนี้
  - Maintain site and Allele level annotation: Yes
  - Maintain genotype level annotation: Yes
- h. วิเคราะห์ผลกระทบต่อโปรตีน ด้วย NGS: Variant Analysis -> SnpEff โดยมีขั้นตอน ดังนี้
  - SnpEff database (find data) Human
  - SnpEff download: GRCh37.75
  - SnpEff eff (annotate variants) โดยกำหนดค่า ดังนี้
    - I. Database from your history: GRCh37.75
    - II. Use Sequence Ontology terms (e.g. missense)
    - III. Use HGVS annotations for amino acid (e.g. p.Gly180Arg/c.538G>C)
- i. ทำการดาวน์โหลดผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ต้องการซึ่งจะอยู่ในรูปของ VCF file ออกมา
- j. เปิด VCF file ด้วยโปรแกรม Genome browser (golden helix)<sup>(49)</sup> ซึ่งใช้ในการดูผลการวิเคราะห์ จากนั้นเลือกข้อมูลที่จะวิเคราะห์ออกมาในรูปแบบของตาราง excel

### 3. การคัดกรองข้อมูล

คัดกรองผลการวิเคราะห์ที่ได้ตามเกณฑ์ ดังนี้

- a. Quality  $\geq$  30
- b. Read depths (DP)  $\geq$  100
- c. SnpEff: effect by impact -> High หรือ Moderate

- d. MAF ใน The Exome Aggregation Consortium (ExAC) database  $<0.01$
- e. วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทำนาย
  - Missense variant วิเคราะห์ด้วย Polyphen-2 (ต้องได้ผลเป็น possibly damaging หรือ probably damaging)<sup>(50)</sup>
  - Frameshift variant หรือ Stop gained variant วิเคราะห์ด้วย Mutationtaster (ต้องได้ผลเป็น disease causing หรือ disease causing automatic)<sup>(51)</sup>
  - Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) score เป็นการรวมผลการทำนายโดยตัดเฉพาะ Variants ที่มีค่า phred (scaled C-score)  $> 20$  (มีผลกระทบร้ายแรงที่สุดในช่วง 1% แรกบน human genome)<sup>(52)</sup>

#### 4. เปรียบเทียบ Database

- a. The Exome Aggregation Consortium (ExAC) database<sup>(53)</sup>
- b. The 1000 Genomes Project Consortium (1000G)<sup>(54)</sup>
- c. ClinVar<sup>(55)</sup>
- d. The Genome Aggregation Database (gnomAD)

#### 3.5.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- a. Descriptive analysis ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ในตัวอย่างประชากรไทยด้วยโปรแกรม IBM SPSS version 22.0
- b. กราฟต่างๆ สร้างใน Microsoft Excel 2013

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในตัวอย่างประชากรไทย

ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในประชากรตัวอย่าง 43 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 6 - 8 โดยผู้เสียชีวิตเป็นเพศชาย 40 คนและเพศหญิง 3 คน อายุเฉลี่ยมีค่า  $35.02 \pm 6.27$  ปี (ช่วง 23-49 ปี) ส่วนใหญ่เสียชีวิตขณะนอนหลับ (58.14%, 25 ตัวอย่าง) ในบางตัวอย่าง มีประวัติคนในครอบครัวเสียชีวิตในลักษณะเดียวกัน (4.65%, 2 ตัวอย่าง) ภูมิลำเนาของผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (51.16%, 22 ตัวอย่าง) รองลงมาคือภาคกลาง (23.25%, 10 ตัวอย่าง) ภาคเหนือ (9.30%, 4 ตัวอย่าง) และภาคตะวันออก (4.65%, 2 ตัวอย่าง) โดยมี 5 ตัวอย่างที่ไม่ทราบภูมิลำเนา (11.63%)

ข้อมูลส่วนสูงและน้ำหนักในประชากรตัวอย่างของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตาย ค่าเฉลี่ยส่วนสูงในเพศชายมีค่า  $169.48 \pm 5.68$  เซนติเมตร และในเพศหญิงมีค่า  $155.33 \pm 6.43$  เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักในเพศชายมีค่า  $63.45 \pm 10.77$  กิโลกรัม และในเพศหญิงมีค่า  $53.33 \pm 10.26$  กิโลกรัม และเมื่อนำมาคำนวณค่า Body mass index (BMI) ในเพศชายและเพศหญิงมีค่า  $22.07 \pm 3.42$  และ  $21.96 \pm 2.83 \text{ kg/mm}^2$  ตามลำดับ โดย 28 ตัวอย่างจาก 43 ตัวอย่าง (65.1%) มีค่า BMI อยู่ในช่วงปกติ ( $18.5-24.9 \text{ kg/mm}^2$ )<sup>(56)</sup> และค่าการกระจายของข้อมูลของ BMI เป็นกราฟเบ้ขวา ดังภาพที่ 12A ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของหัวใจในเพศชายและเพศหญิงมีค่า  $344.25 \pm 46.82$  และ  $261.67 \pm 47.26$  กรัม ตามลำดับ โดย 29 ตัวอย่างจาก 43 ตัวอย่าง (67.4%) มีค่าน้ำหนักของหัวใจอยู่ในช่วงปกติ (เพศชาย 270-360 กรัมและเพศหญิง 200-280 กรัม<sup>(22)</sup>) ค่าการกระจายของข้อมูลอยู่ในช่วงปกติ ดังภาพที่ 12B เนื่องจากขนาดของหัวใจมีความเกี่ยวข้องกับค่า BMI จึงทำการเทียบค่า BMI กับน้ำหนักของหัวใจพบว่าตัวอย่างที่มีค่าน้ำหนักหัวใจสูงกว่าค่าปกติโดยมีค่า BMI ปกติมีจำนวน 10 ตัวอย่าง แสดงถึงน้ำหนักหัวใจมีค่าสูงจริง

สำหรับผลการตรวจชันสูตรด้วยตาเปล่าของกล้ามเนื้อหัวใจพบว่า มีค่าปกติในประชากรตัวอย่างมากกว่าครึ่งหนึ่ง (65.12%, 28 ตัวอย่าง) มีจุดเลือดออก 8 ตัวอย่าง (18.60%) มีรอยสีแดงคล้ำ 5 ตัวอย่าง (11.63%) และพบพังผืด 2 ตัวอย่าง (4.65%)

ตารางที่ 6 แสดงผลข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในตัวอย่างประชากรไทย

| ID  | Sex | Age at death (Years) | Situation at death | Family history | Domicile | Height (cm) | Weight (kg) | BMI   | Heart weight (g) | Macroscopic examination |
|-----|-----|----------------------|--------------------|----------------|----------|-------------|-------------|-------|------------------|-------------------------|
| T01 | M   | 33                   | -                  | N              | C        | 159         | 58          | 22.94 | 275              | Normal                  |
| T02 | M   | 23                   | -                  | N              | C        | 170         | 50          | 17.30 | 280              | Discoloration           |
| T03 | M   | 34                   | Sleep              | N              | C        | 172         | 66          | 22.31 | 385              | Normal                  |
| T04 | M   | 41                   | Sleep              | N              | NE       | 160         | 43          | 16.80 | 300              | Hemorrhage              |
| T05 | M   | 24                   | -                  | N              | C        | 168         | 60          | 21.26 | 290              | Discoloration           |
| T06 | M   | 37                   | -                  | N              | NE       | 180         | 72          | 22.22 | 425              | Normal                  |
| T07 | M   | 30                   | Sleep              | N              | NE       | 164         | 74          | 27.51 | 340              | Normal                  |
| T08 | M   | 43                   | Sleep              | N              | N        | 164         | 52          | 19.33 | 300              | Normal                  |
| T09 | M   | 28                   | -                  | N              | -        | 180         | 72          | 22.22 | 320              | Discoloration           |
| T10 | F   | 37                   | -                  | N              | -        | 148         | 42          | 19.17 | 245              | Normal                  |
| T11 | M   | 40                   | Sleep              | Y              | NE       | 168         | 82          | 29.05 | 400              | Normal                  |
| T12 | F   | 30                   | -                  | N              | -        | 160         | 56          | 21.88 | 315              | Normal                  |
| T13 | M   | 33                   | Sleep              | N              | N        | 164         | 52          | 19.33 | 310              | Normal                  |
| T14 | M   | 35                   | -                  | N              | -        | 162         | 70          | 26.67 | 365              | Normal                  |
| T15 | M   | 37                   | Sleep              | N              | NE       | 167         | 73          | 26.18 | 305              | Discoloration           |
| T16 | M   | 30                   | Sleep              | N              | NE       | 170         | 62          | 21.45 | 360              | Hemorrhage              |



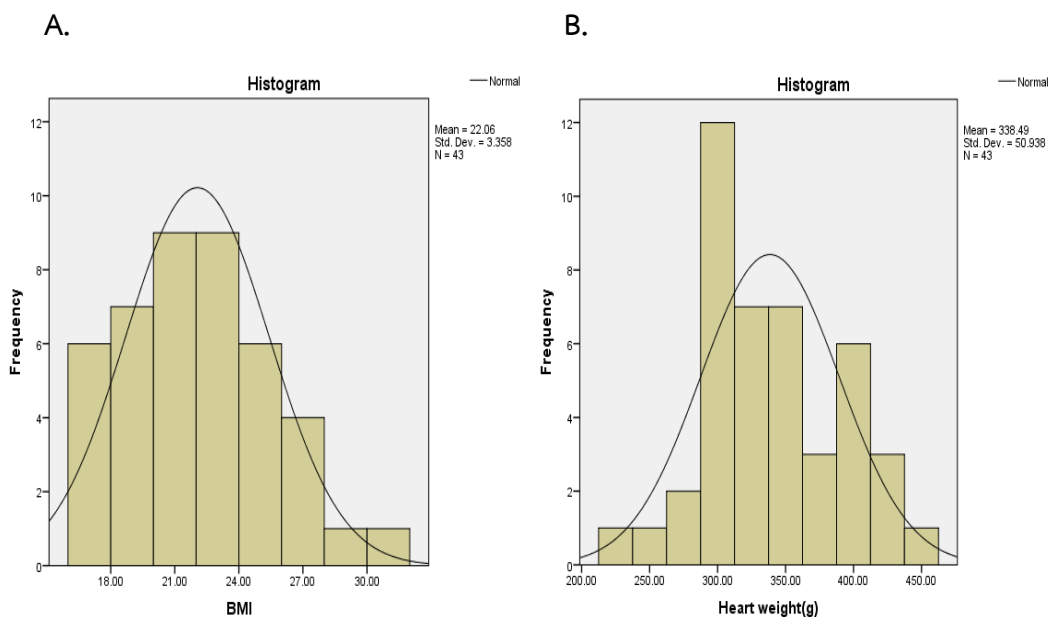
ตารางที่ 6 แสดงผลข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในตัวอย่างประชากรไทย (ต่อ)

| ID  | Sex | Age at death (Years) | Situation at death | Family history | Domicile | Height (cm) | Weight (kg) | BMI   | Heart weight (g) | Macroscopic examination |
|-----|-----|----------------------|--------------------|----------------|----------|-------------|-------------|-------|------------------|-------------------------|
| T17 | M   | 35                   | Sleep              | N              | NE       | 176         | 56          | 18.08 | 300              | Normal                  |
| T18 | M   | 32                   | Sleep              | N              | NE       | 173         | 80          | 26.73 | 340              | Normal                  |
| T19 | M   | 25                   | Sleep              | N              | E        | 174         | 91          | 30.06 | 380              | Hemorrhage              |
| T20 | M   | 33                   | Sleep              | N              | NE       | 171         | 67          | 22.91 | 390              | Normal                  |
| T21 | M   | 28                   | Sleep              | N              | NE       | 170         | 52          | 17.99 | 310              | Normal                  |
| T22 | M   | 40                   | -                  | N              | E        | 169         | 49          | 17.16 | 315              | Normal                  |
| T23 | M   | 40                   | -                  | N              | C        | 169         | 58          | 20.31 | 305              | Normal                  |
| T24 | M   | 49                   | -                  | N              | NE       | 181         | 76          | 23.20 | 390              | Normal                  |
| T25 | M   | 34                   | Sleep              | N              | -        | 162         | 52          | 19.81 | 360              | Normal                  |
| T26 | M   | 45                   | Sleep              | Y              | NE       | 166         | 60          | 21.77 | 450              | Fibrosis                |
| T27 | M   | 37                   | Sleep              | N              | NE       | 170         | 68          | 23.53 | 345              | Fibrosis                |
| T28 | M   | 36                   | Sleep              | N              | NE       | 161         | 67          | 25.85 | 345              | Normal                  |
| T29 | M   | 36                   | Sleep              | N              | N        | 169         | 56          | 19.61 | 300              | Normal                  |
| T30 | M   | 34                   | -                  | N              | NE       | 174         | 73          | 24.11 | 300              | Hemorrhage              |
| T31 | M   | 37                   | -                  | N              | C        | 166         | 70          | 25.40 | 355              | Normal                  |
| T32 | M   | 24                   | -                  | N              | NE       | 172         | 52          | 17.58 | 320              | Hemorrhage              |
| T33 | M   | 49                   | Sleep              | N              | N        | 174         | 60          | 19.82 | 390              | Hemorrhage              |

ตารางที่ 6 แสดงผลข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายในตัวอย่างประชากรไทย (ต่อ)

| ID  | Sex | Age at death (Years) | Situation at death | Family history | Domicile | Height (cm) | Weight (kg) | BMI   | Heart weight (g) | Macroscopic examination |
|-----|-----|----------------------|--------------------|----------------|----------|-------------|-------------|-------|------------------|-------------------------|
| T34 | M   | 31                   | Sleep              | N              | NE       | 176         | 50          | 16.14 | 395              | Normal                  |
| T35 | F   | 44                   | -                  | N              | C        | 158         | 62          | 24.84 | 225              | Normal                  |
| T36 | M   | 36                   | -                  | N              | NE       | 170         | 59          | 20.42 | 315              | Normal                  |
| T37 | M   | 24                   | Sleep              | N              | C        | 181         | 81          | 24.72 | 320              | Normal                  |
| T38 | M   | 36                   | Sleep              | N              | NE       | 170         | 60          | 20.76 | 425              | Discoloration           |
| T39 | M   | 41                   | Sleep              | N              | NE       | 171         | 72          | 24.62 | 410              | Hemorrhage              |
| T40 | M   | 34                   | Sleep              | N              | C        | 163         | 55          | 20.70 | 300              | Normal                  |
| T41 | M   | 35                   | -                  | N              | C        | 170         | 68          | 23.53 | 425              | Hemorrhage              |
| T42 | M   | 39                   | Sleep              | N              | NE       | 170         | 64          | 22.15 | 325              | Normal                  |
| T43 | M   | 37                   | -                  | N              | NE       | 163         | 56          | 21.08 | 305              | Normal                  |

M: เพศชาย, F: เพศหญิง; C: ภาคกลาง, N: ภาคเหนือ; NE: ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, E: ภาคตะวันออก และ -: ไม่ทราบข้อมูล



ภาพที่ 12 แสดงการกระจายของข้อมูลโดย A แสดง histogram ของ BMI เป็นกราฟเบ้ซ้าย B แสดง histogram ของน้ำหนักหัวใจเป็นการแจกแจงปกติ

#### 4.2 ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอ

จากการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวิจัยเบื้องต้น และการวิจัย 86 ตัวอย่างด้วยวิธี Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit และเครื่อง Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8

ตารางที่ 7 แสดงผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวิจัยเบื้องต้น (14 ตัวอย่าง)

| ID  | ความเข้มข้น (ng/μl) | ID  | ความเข้มข้น (ng/μl) |
|-----|---------------------|-----|---------------------|
| T16 | 1.26                | T38 | 0.94                |
| T24 | 1.56                | T39 | 0.56                |
| T26 | 4.50                | T40 | 2.71                |
| T27 | 16.63               | T41 | 4.18                |
| T33 | 2.55                | T42 | 3.27                |
| T34 | 1.88                | C09 | 1.59                |
| T36 | 0.48                | C24 | 1.66                |

จากตารางความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการวิจัยเบื้องต้น (14 ตัวอย่าง) ที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.14 ng/μl โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.48-16.63 ng/μl เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นต้องการ

10-25 ng และปริมาตรไม่เกิน 4  $\mu\text{l}$  จึงทำการระเหยน้ำออกด้วยความร้อนเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการในตัวอย่าง T16, T36, T38 และ T39

ตารางที่ 8 แสดงผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวิจัย 86 ตัวอย่าง

| Sample | ความเข้มข้น (ng/ $\mu\text{l}$ ) | Sample | ความเข้มข้น (ng/ $\mu\text{l}$ ) | Sample | ความเข้มข้น (ng/ $\mu\text{l}$ ) |
|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|
| T01    | 0.77                             | T30    | 1.18                             | C17    | 2.30                             |
| T02    | 0.05                             | T31    | 0.40                             | C18    | 0.84                             |
| T03    | 2.61                             | T32    | 0.14                             | C19    | 1.33                             |
| T04    | 1.70                             | T33    | 2.55                             | C20    | 1.07                             |
| T05    | 1.75                             | T34    | 1.88                             | C21    | 1.40                             |
| T06    | 7.65                             | T35    | 1.89                             | C22    | 1.34                             |
| T07    | 1.63                             | T36    | 0.90                             | C23    | 1.25                             |
| T08    | 0.81                             | T37    | 1.80                             | C24    | 0.72                             |
| T09    | 0.75                             | T38    | 0.25                             | C25    | 1.54                             |
| T10    | 1.60                             | T39    | 0.83                             | C26    | 1.75                             |
| T11    | 1.03                             | T40    | 2.71                             | C27    | 2.19                             |
| T12    | 1.21                             | T41    | 4.18                             | C28    | 1.89                             |
| T13    | 3.91                             | T42    | 3.26                             | C29    | 0.62                             |
| T14    | 5.13                             | T43    | 0.93                             | C30    | 1.03                             |
| T15    | 0.51                             | C01    | 0.92                             | C31    | 1.76                             |
| T16    | 1.25                             | C02    | 1.65                             | C32    | 0.87                             |
| T17    | 0.69                             | C03    | 1.53                             | C33    | 1.08                             |
| T18    | 0.69                             | C04    | 1.12                             | C34    | 1.11                             |
| T19    | 0.88                             | C05    | 1.19                             | C35    | 1.03                             |
| T20    | 18.41                            | C06    | 1.43                             | C36    | 1.55                             |
| T21    | 1.11                             | C07    | 1.67                             | C37    | 0.39                             |
| T22    | 0.29                             | C08    | 1.17                             | C38    | 0.63                             |
| T23    | 0.60                             | C09    | 1.82                             | C39    | 0.72                             |
| T24    | 1.56                             | C10    | 1.16                             | C40    | 0.69                             |
| T25    | 0.47                             | C12    | 1.47                             | C41    | 2.88                             |
| T26    | 4.50                             | C13    | 1.31                             | C42    | 2.99                             |
| T27    | 16.62                            | C14    | 0.37                             | C43    | 0.56                             |
| T28    | 0.59                             | C15    | 3.51                             |        |                                  |
| T29    | 0.42                             | C16    | 4.05                             |        |                                  |

จากตารางความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการวิจัย 86 ตัวอย่างที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.92 ng/ $\mu$ l โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.05-18.41 ng/ $\mu$ l ทำการระเหยน้ำออกด้วยความร้อนเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการในตัวอย่างที่มีค่าน้อยกว่า 2.50 ng/ $\mu$ l

#### 4.4 ผลคุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง Miseq

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ด้วยวิธี NGS พบว่าคุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเครื่อง Miseq ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 คุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูล

|   | Preliminary |                  | 86 samples |                  |
|---|-------------|------------------|------------|------------------|
|   | optimal     | result           | optimal    | result           |
| Yield (Gbp)                             | 1.2         | 1.82             | 5.1        | 4.02             |
| Cluster density<br>(k/mm <sup>2</sup> ) | 1000-1200   | 1318 $\pm$ 34    | 1000-1200  | 746 $\pm$ 27     |
| Cluster PF (%)                          | 80          | 83.49 $\pm$ 1.24 | 80         | 91.32 $\pm$ 1.60 |
| Qscore (read 1)                         | >q30        | 80.95 %          | >q30       | 76.07 %          |

จากตารางแสดงค่าปริมาณของข้อมูลที่วิเคราะห์ทั้งหมด (Yield) ความหนาแน่นของข้อมูลที่วิเคราะห์ต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (Cluster density) ร้อยละของจำนวนข้อมูลที่ผ่านมาเกณฑ์การกรอง (Cluster PF) และค่าความถูกต้องของลำดับเบสที่วิเคราะห์ โดยวิเคราะห์เฉพาะ read 1 (สำหรับการวิเคราะห์แบบ Single end) ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า Q30

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของการวิจัยเบื้องต้น จำนวน 14 ตัวอย่างมีค่าปริมาณของข้อมูลที่วิเคราะห์ทั้งหมด 1.82 Gbps โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.05-13.30 Gbps ต่อตัวอย่าง ความหนาแน่นของข้อมูลที่วิเคราะห์ต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร มีค่า 1,318 $\pm$ 34 K/mm<sup>2</sup> ผ่านเกณฑ์การกรองร้อยละ 83.49 $\pm$ 1.24 ผลที่ได้มีค่า over-cluster เมื่อเทียบกับค่าที่เหมาะสมที่แนะนำ ค่าความถูกต้องของลำดับเบสที่วิเคราะห์ที่มีค่ามากกว่า Q30 คิดเป็นร้อยละ 80.95

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของการวิจัยจำนวน 86 ตัวอย่างมีค่าปริมาณของข้อมูลที่วิเคราะห์ทั้งหมด 4.02 Gbps โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.07-1.47 Gbps ต่อตัวอย่าง ความหนาแน่นของข้อมูลที่วิเคราะห์ต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร มีค่า 746 $\pm$ 27 K/mm<sup>2</sup> ผ่านเกณฑ์การกรองร้อยละ 91.32 $\pm$ 1.60

ผลที่ได้มีค่าน้อยกว่าค่าที่เหมาะสมที่แนะนำ ค่าความถูกต้องของลำดับเบสที่วิเคราะห์ที่มีค่ามากกว่า Q30 คิดเป็นร้อยละ 76.07

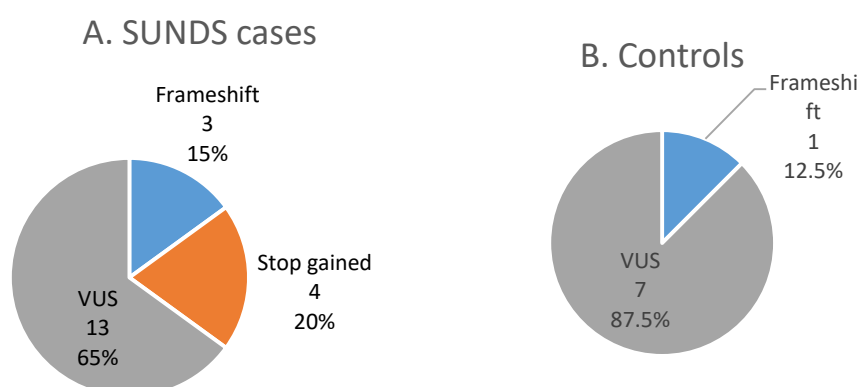
#### 4.5 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของข้อมูล

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน *SCN5A* ด้วยวิธี NGS และทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม FASTQC ของ Galaxy ค่าคุณภาพต่อลำดับเบส (Per base quality) ในการวิจัยเบื้องต้นและการวิจัยจำนวน 86 ตัวอย่างได้ผลคิดเป็นร้อยละ 90.46 และ 80.96 ตามลำดับ

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม

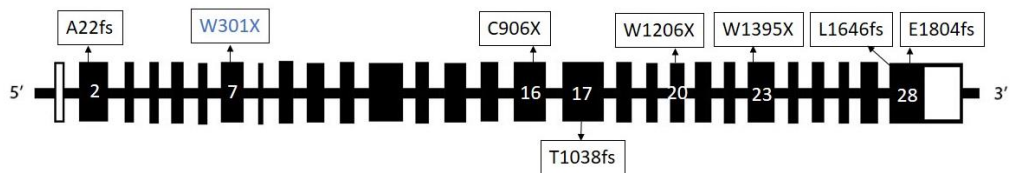
ในตัวอย่างจากกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายจำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดจำนวน 20 ตำแหน่งจาก 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.26 โดยแบ่งเป็น frameshift variant 3 ตำแหน่ง (15%) stop gained variant 4 ตำแหน่ง (20%) และ variants of unknown significant (VUS) ซึ่งเป็น missense variant จำนวน 13 ตำแหน่ง (65%) ดังแสดงในกราฟวงกลมภาพที่ 15A

ในตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมจำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดจำนวน 8 ตำแหน่งจาก 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.28 โดยแบ่งเป็น frameshift variant 1 ตำแหน่ง (12.5%) และ VUS จำนวน 7 ตำแหน่ง (87.5%) ดังแสดงในกราฟวงกลม ภาพที่ 15B

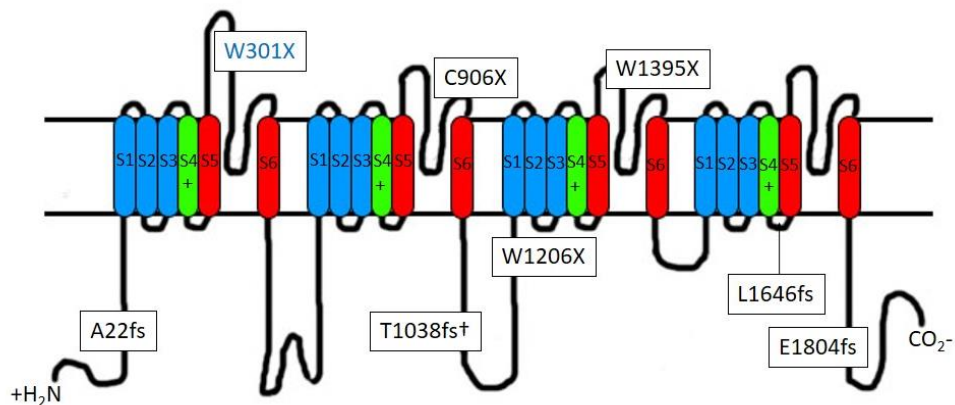


ภาพที่ 13 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* A ในกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตาย B ในกลุ่มควบคุม

เมื่อพิจารณาเฉพาะความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff (frameshift variant และ stop gained variant) สามารถสรุปข้อมูลได้ดังตารางที่ 10 โดยแสดงตำแหน่งบนยีน *SCN5A* (ภาพที่ 16) และตำแหน่งบนโปรตีน *SCN5A* (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 14 แสดงตำแหน่งของความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff จากกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตาย (บน) และกลุ่มควบคุม (ล่าง) โดย variant ที่รู้อยู่แล้ว (สีฟ้า) และ variant ที่พบใหม่ (สีดำ)



ภาพที่ 15 แสดงตำแหน่งของความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนโปรตีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff โดย variant ที่รู้อยู่แล้ว (สีฟ้า) และ variant ที่พบใหม่ (สีดำ)  
 †ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบในกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff จากกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม

| ID  | Exon | Type of variant | Mutation CDS | Mutation AA | Protein region            | dbSNP/ Ref. |
|-----|------|-----------------|--------------|-------------|---------------------------|-------------|
| T01 | 23   | Stop gained     | c.4185G>A    | W1395X      | Extracellular (DIIIS5-S6) | Novel       |
| T03 | 16   | Stop gained     | c.2718C>A    | C906X       | Extracellular (DIIS5-S6)  | Novel       |
| T11 | 2    | Frameshift      | c.65delC     | A22fs       | N-terminus                | Novel       |
| T25 | 7    | Stop gained     | c.903G>A     | W301X       | Extracellular (DIS5-S6)   | Ref. (57)   |
| T27 | 28   | Frameshift      | c.4935delG   | L1646fs     | DIVS4-DIVS5               | Novel       |
| T33 | 28   | Frameshift      | c.5409delA   | E1804fs     | C-terminus                | Novel       |
| T34 | 20   | Stop gained     | c.3618G>A    | W1206X      | DII-DIII                  | Novel       |
| C30 | 17   | Frameshift      | c.3111delC   | T1038fs     | DII-DIII                  | Novel       |

ID: T คือ SUNDS cases, C คือ controls, Mutation CDS และ Amino acid มาจาก ENST00000333535 โดยใช้ SnpEff, Protein region ตาม Uniprot database<sup>(58)</sup> dbSNP: NA คือ ไม่มีข้อมูล

จากความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ที่พบทั้งหมดเป็น variant ที่ทราบอยู่แล้วจำนวน 8 ตำแหน่ง โดยพบในกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตาย 6 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น stop gained variant 1 ตำแหน่ง คือ W301X และ VUS 5 ตำแหน่ง คือ A413T, G599R, R893L, A964T และ V2016M ส่วนในกลุ่มควบคุมพบ VUS 2 ตำแหน่งคือ G833R และ V1777M ข้อมูล AF เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่างๆ แสดงในตารางที่ 11



ตารางที่ 11 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ซึ่งเป็น variant ที่ทราบอยู่แล้ว (พบใน dbSNP หรืองานวิจัยก่อนหน้า)

| ID  | Exon | Type of variant | Mutation CDS | Mutation AA | Protein region          | dbSNP/ Ref. | AF    | ExAC     | gnomAD   | Clinvar                             |
|-----|------|-----------------|--------------|-------------|-------------------------|-------------|-------|----------|----------|-------------------------------------|
| T01 | 10   | Missense        | c.1237G>A    | A413T       | IDI-II                  | rs199473110 | 0.013 | 1.66E-05 | 1.22E-05 | LQT: not provide                    |
| T01 | 17   | Missense        | c.2890G>A    | A964T       | IDI-III                 | Ref. (62)   | 0.020 | NA       | NA       | BrS:<br>Uncertain significance      |
| T11 | 16   | Missense        | c.2678G>T    | R893L       | Pore-forming (DIS5-S6)  | rs199473172 | 0.013 | NA       | NA       | NA                                  |
| T11 | 28   | Missense        | c.6046G>A    | V2016M      | C-terminus              | rs762981322 | 0.013 | 3.70E-05 | 5.58E-06 | BrS:<br>Uncertain significance      |
| T16 | 12   | Missense        | c.1795G>A    | G599R       | IDI-II                  | rs779691420 | 0.045 | 8.80E-06 | 8.30E-06 | NA                                  |
| T25 | 7    | Stop gained     | c.903G>A     | W301X       | Extracellular (DIS5-S6) | Ref. (57)   | 0.013 | NA       | NA       | NA                                  |
| C16 | 16   | Missense        | c.2497G>A    | G833R       | DIS4-S5                 | rs45475899  | 0.013 | 3.47E-04 | 1.74E-04 | LQT, BrS:<br>Uncertain significance |
| C36 | 28   | Missense        | c.5329G>A    | V1777M      | C-terminus              | rs199473314 | 0.014 | 1.16E-04 | 5.30E-05 | LQT: Likely pathogenic              |

#### 4.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับเบสที่พบได้บ่อย (common variants) บนยีน *SCN5A*

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม พบความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยบนยีน *SCN5A* ใน 2 ตำแหน่ง คือ H558R และ R1193Q ซึ่งทั้งสองตำแหน่งสามารถพบได้มากในประชากรเอเชียตะวันออก โดยมีค่า AF ใน ExAC database เท่ากับ 0.10 และ 0.07 ตามลำดับ H558R พบในตัวอย่างจากกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตาย 7 ตัวอย่าง (AF = 0.10) และในกลุ่มควบคุม 8 ตัวอย่าง (AF = 0.15) ส่วน R1193Q พบในตัวอย่างจากกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตาย 3 ตัวอย่าง (AF = 0.04) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยบนยีน *SCN5A*

| Exon | Mutation CDS | Mutation AA | Protein region | dbSNP      | AFcon | AFcase | ExAC (EAS) |
|------|--------------|-------------|----------------|------------|-------|--------|------------|
| 12   | c.1673A>G    | H558R       | DI-DII         | rs1805124  | 0.15  | 0.10   | 0.10       |
| 20   | c.3578G>A    | R1193Q      | DII-DIII       | rs41261344 | -     | 0.04   | 0.07       |

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยพบรูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ที่มีการแปรผันในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายในประชากรไทย จากตัวอย่างกลุ่มผู้เสียชีวิตชนิดไหลตายจำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff จำนวน 7 ตำแหน่งจาก 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.28 โดยผลของความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในงานวิจัยนี้มีค่าน้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Vatta และคณะ ซึ่งทำในประชากรไทยเช่นกัน โดยมีค่าร้อยละ 20 แต่เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าวมีเกณฑ์การคัดเข้าเป็นแบบกลุ่มอาการ BrS<sup>(6)</sup> ผลที่ได้จึงมีค่าสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Kapplinger และคณะที่พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* มีค่าร้อยละ 20 - 25 ในผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ BrS<sup>(47)</sup> ในขณะที่ ผลของความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายจากการศึกษาในประชากรจีนมีค่าร้อยละ 6.5 - 8<sup>(14, 18)</sup> ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้มีค่าสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายในประชากรไทยเช่นเดียวกับในรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายมากกว่ายีนอื่นๆ<sup>(18)</sup>

#### 5.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้เสียชีวิตจากไหลตายในประชากรไทย

จากข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างซึ่งเป็นผู้เสียชีวิตจากไหลตายในประชากรไทยพบว่า ผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่เป็นเพศชาย อายุระหว่าง 20 - 49 ปี (อายุเฉลี่ย 35.02±6.27 ปี) ส่วนใหญ่เสียชีวิตขณะนอนหลับ และผู้เสียชีวิตมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมากกว่าครึ่งหนึ่งตามที่มีในรายงานก่อนหน้านี้<sup>(1, 2)</sup> โดยมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างมากที่สุด (14 ตัวอย่าง) และจังหวัดที่พบมากที่สุดคือ อุบลราชธานี (5 ตัวอย่าง) แต่ความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ที่พบไม่ขึ้นกับภาคและจังหวัด ตัวอย่างที่มีประวัติบุคคลในครอบครัวเสียชีวิตแบบเดียวกัน 2 ราย โดยมีตัวอย่างหนึ่ง (T11) ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff

ข้อมูลน้ำหนักและส่วนสูงนำมาใช้ในการคำนวณค่า BMI เพื่อช่วยในการวิเคราะห์น้ำหนักหัวใจของกลุ่มตัวอย่างผู้เสียชีวิตว่ามีค่าอยู่ในช่วงปกติหรือไม่ เนื่องจากขนาดของหัวใจมีความเกี่ยวข้องกับ

ค่า BMI พบว่ามีตัวอย่างที่มีค่าน้ำหนักหัวใจสูงกว่าค่าปกติโดยมีค่า BMI ปกติจำนวน 10 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าน้ำหนักหัวใจมีแนวโน้มสูงกว่าค่าปกติในกลุ่มอาการ SUNDS ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานของ Zheng และคณะที่เสนอว่า กลุ่มอาการ SUNDS ซึ่งเกิดในกลุ่มคนอายุน้อย เป็นกลุ่มอาการที่เป็น transitory stage ของ cardiomyopathy<sup>(18)</sup>

## 5.2 สรุปผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอและการทำ Electrophoresis

เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เป็น FTA blood จากผู้เสียชีวิตด้วยกลุ่มอาการ SUNDS ซึ่งมีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเออย่างมาก ความเข้มข้นที่สกัดได้จึงมีค่าค่อนข้างต่ำ และบางตัวอย่างมีปริมาณเลือดน้อยมาก จึงจำเป็นต้องทำการระเหยน้ำออกเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการคือ 10-25 ng และใส่ตัวอย่างละไม่เกิน 4 ไมโครลิตร

ส่วนการวิเคราะห์ผล PCR product นั้นเลือกใช้วิธีการทำ Electrophoresis ด้วย 4% agarose gel เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก แต่ด้วยเหตุที่ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นต่ำ วิธีนี้จึงอาจมีความไวไม่พอ ทำให้ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 310 bp ในบางตัวอย่าง

## 5.3 สรุปผลคุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง Miseq

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน *SCN5A* ด้วยวิธี NGS พบว่าคุณภาพของการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเครื่อง Miseq ในการวิจัยเบื้องต้นมีค่า over-cluster แต่ร้อยละของจำนวนข้อมูลที่ผ่านเกณฑ์การกรอง (Cluster PF) มีค่ามากกว่า 80 ซึ่งมีปริมาณข้อมูลเพียงพอต่อการวิเคราะห์ผล ในการวิจัยจำนวน 86 ตัวอย่าง ค่าปริมาณของข้อมูลที่วิเคราะห์ทั้งหมด (Yield) มีค่าต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม แต่ร้อยละของจำนวนข้อมูลที่ผ่านเกณฑ์การกรอง (Cluster PF) มีค่าสูงมาก จึงมีปริมาณข้อมูลเพียงพอต่อการวิเคราะห์ผลเช่นกัน

## 5.4 สรุปผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน *SCN5A* ที่มีการแปรผันซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน *SCN5A* ในงานวิจัยนี้สนใจเฉพาะความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff เช่น frameshift variant และ stop gained variant เนื่องจากความแปรผันทางพันธุกรรมเหล่านี้พบได้น้อยในฐานข้อมูลจาก ExAC ซึ่งน่าจะส่งผลกระทบต่อโปรตีน *SCN5A* มากกว่าความแปรผันทางพันธุกรรมแบบอื่น<sup>(31)</sup>

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน *SCN5A* ที่มีการแปรผันในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตาย พบว่ามีเพียง W301X ที่เคยมีรายงานในประชากรชาวกรีซ<sup>(57)</sup> ส่วน 6 ตำแหน่งที่เหลือเป็น

variants ที่พบใหม่ ซึ่งอยู่บริเวณที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโปรตีน SCN5A โดย stop gained variants 2 ตำแหน่ง คือ W1395X และ C906X อยู่บริเวณ extracellular ระหว่าง S5 และ S6 ซึ่งประกอบเป็นช่องของ sodium channel<sup>(31, 34)</sup> และ stop gained variant อีกตำแหน่งคือ W1206X อยู่บริเวณ intracellular linker domains ที่เชื่อมต่อระหว่างโดเมน DII และ DIII

สำหรับ frameshift variants 3 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกคือ A22fs อยู่ใน N-terminus ซึ่งหาก frameshift variants เกิดในตำแหน่งที่ใกล้จุดเริ่มต้นของโปรตีนมากเท่าไรก็ยิ่งส่งผลให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงไปมากเท่านั้น<sup>(59)</sup> ส่วน frameshift variants อีก 2 ตำแหน่งอยู่ใน exon 28 คือ L1646fs และ E1804fs ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อโปรตีนน้อยกว่าตำแหน่งแรก ตามทฤษฎีดังกล่าวข้างต้น

ส่วนการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ที่มีการแปรผันในกลุ่มควบคุม พบเพียง frameshift variant 1 ตำแหน่ง คือ T1038fs ซึ่งไม่มีข้อมูลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ สมมติฐานของการพบลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ที่มีการแปรผันในกลุ่มควบคุมสามารถอธิบายได้ตามข้อมูลจากบทความก่อนหน้านี้ซึ่งเสนอว่า กลุ่มอาการ SUNDS เป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย โดยนอกจากปัจจัยทางพันธุกรรมแล้ว ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความเครียด ก็อาจส่งเสริมให้เกิดการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ได้<sup>(18)</sup>

### 5.5 สรุปผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ที่มีการแปรผันซึ่งไม่ทราบความสำคัญแน่ชัด (Variants of unknown significant: VUS)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ที่มีการแปรผันในงานวิจัยชิ้นนี้ พบ missense variants ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มของลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ที่มีการแปรผันซึ่งไม่ทราบความสำคัญแน่ชัดในหลายตำแหน่ง โดยส่วนใหญ่เป็น variants ที่พบใหม่ และไม่มีข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมา

ในลำดับเบสของ exon บนยีน SCN5A ที่มีการแปรผันในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายพบว่า มี VUS เพียง 4 ตำแหน่งจาก 13 ตำแหน่ง ที่พบข้อมูลในฐานข้อมูล dbSNP ได้แก่

1. A413T มีการศึกษาพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ LQTS แต่ไม่มีรายงานผล pathogenicity ใน ClinVar<sup>(60)</sup>
2. G599R ไม่มีข้อมูล pathogenicity ของ variant นี้
3. R893L มีข้อมูลรายงานใน ClinVar (RCV000183179.1) ว่าก่อให้เกิดกลุ่มอาการ BrS (Last evaluated: Jul 18, 2011)

4. V2016M มีรายงานการศึกษาจำนวนมากสนับสนุนข้อมูล pathogenicity ของตำแหน่งนี้ ซึ่ง V2016 เป็นกรดอะมิโนตัวสุดท้ายของโปรตีน SCN5A และเป็นส่วนประกอบของ PDZ domain-binding motif (กรดอะมิโน 3 ตัวสุดท้ายคือ SIV) V2016M มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการ BrS โดยในการศึกษาในหนูที่ไม่มี SIV พบว่า V2016M ลดการแสดงออกของโปรตีน SCN5A และกระแสของประจุโซเดียม โดยเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้านข้างซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ anisotropy of ventricular conduction<sup>(61)</sup>

ส่วนความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* อื่นที่มีรายงานในการศึกษาก่อนหน้าคือ A964T ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการ BrS ใน Clinvar (รายงานผลเป็น Uncertain significance, Last reviewed: Jul 5, 2017, SCV000637111.1) และถูกประเมินตามเกณฑ์ของ ACMG-AMP variant classification<sup>(62)</sup>

ตัวอย่างจากกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* มากที่สุดคือ T11 ซึ่งพบถึง 5 ตำแหน่ง ได้แก่ A22fs, E678G, H880Y, R893L และ V2016M โดยสองตำแหน่งหลังมีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการ BrS และมีประวัติครอบครัวเสียชีวิตในลักษณะเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสียชีวิตชนิดไหลตายที่มีประวัติครอบครัวอาจเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการ BrS

ความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน *SCN5A* ในกลุ่มควบคุม พบ VUS 2 ตำแหน่งที่มีข้อมูลใน ClinVar คือ G833R และ V1777M โดยในการศึกษาก่อนหน้าพบว่าทั้งสองตำแหน่งเกี่ยวข้องกับ LQTS นอกจากนี้ G833R ยังมีรายงานในกลุ่มอาการ BrS (clinical significance: not provided ใน ClinVar) แต่ในการศึกษาของ Kapplinger และคณะในปี 2015 รายงานว่าตำแหน่งนี้เป็น polymorphism เนื่องจากพบในตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมมากกว่าหนึ่งตัวอย่างเมื่อเทียบกับผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ BrS และ LQTS<sup>(63)</sup> สำหรับ V1777M มีการรายงานใน ClinVar ว่าเป็น likely pathogenic (last reviewed: Mar 2, 2017, SCV000235524.12) โดยพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับผู้ป่วย LQTS ซึ่งมี functional 2:1 AV block (AVB) การแสดงออกของ V1777M แบบ Heterozygous ทำให้เกิดการลดลงของกระแสของประจุโซเดียมในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะเมื่อมี tetrodotoxin<sup>(64)</sup>

## 5.6 สรุปผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับเบสที่พบได้บ่อย (common variants) บนยีน SCN5A

ความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยบนยีน SCN5A ในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี 2 ตำแหน่ง คือ H558R และ R1193Q ซึ่งพบในการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับเบสบนยีน SCN5A ในงานวิจัยชิ้นนี้เช่นกัน โดยการแปลผลของความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยบนยีน SCN5A มีความขัดแย้งกันในหลายการศึกษา เนื่องจากพบทั้งในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายและกลุ่มควบคุม โดยมีค่า AF ที่สูง

ตั้งแต่ปีค.ศ. 2003 มีการศึกษาพบว่า H558R เมื่อพบร่วมกับความแปรผันทางพันธุกรรมอื่น เช่น Q1077del, T512I และ M1766L สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของ sodium ion channel ได้<sup>(65-67)</sup> ในขณะที่ R1193Q มีรายงาน pathogenic ตั้งแต่ปีค.ศ. 2002 ด้วย electrophysiological study<sup>(6)</sup> อย่างไรก็ตาม หลายการศึกษาต่อจากนั้นเลือกรายงาน R1193Q ว่าเป็น polymorphism เนื่องจากพบได้บ่อยในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึงกระนั้น ก็มีการศึกษาผลกระทบต่อโปรตีนด้วย electrophysiological study ในหลายงานวิจัย และพบว่า R1193Q ทำให้กระแสของประจุโซเดียมคงอยู่นานขึ้น เกิด prolong QTc ใน LQTS และกลุ่มอาการ BrS<sup>(68)</sup> ในประชากรไทย มีการศึกษาพบว่า R1193Q เพิ่มโอกาสเกิด Defibrillator Shocks ในผู้ป่วยด้วยกลุ่มอาการ BrS<sup>(69)</sup>

### 5.6 ข้อจำกัดของงานวิจัย

1. ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างผู้เสียชีวิตจากกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายบางส่วนไม่ครบ เนื่องจากการเก็บตัวอย่างแบบย้อนหลัง ด้วยเหตุที่ตัวอย่างผู้เสียชีวิตจากกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายหายาก งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีการเก็บตัวอย่างแบบย้อนหลัง จึงทำให้ข้อมูลพื้นฐานบางส่วน เช่น ภูมิฐานะหรือสถานการณ์ขณะเสียชีวิตในบางตัวอย่างไม่ได้มีการบันทึกไว้

2. คุณภาพของดีเอ็นเอต่ำเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่เก็บหลังการเสียชีวิต โดยตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้มาจากผู้เสียชีวิตจากกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายซึ่งเก็บไว้หลังการเสียชีวิต อีกทั้งยังเก็บรักษาด้วย FTA ไว้เป็นเวลานาน (บางตัวอย่างเก็บนานถึง 5 ปี) ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของตัวอย่างและคุณภาพของดีเอ็นเอต่ำลง แต่อย่างไรก็ตาม ข้อมูลรูปแบบลำดับสารพันธุกรรมที่มีการแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A สามารถวิเคราะห์ได้สำเร็จด้วยคุณภาพที่ดี 19 ตัวอย่างจาก 43 ตัวอย่าง และคุณภาพของลำดับเบสทั้งหมดสำหรับ 86 ตัวอย่าง มีค่าร้อยละ 80.96

3. ตัวอย่างที่คัดเข้ามาเป็นกลุ่มควบคุมในงานวิจัยนี้ใช้การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจได้ผลปกติ เป็นเกณฑ์คัดเข้า แต่ก็ยังพบความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในบางตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการตรวจด้วยวิธีอื่น เช่น exercise stress test เพื่อสร้างเกณฑ์การคัดเข้าของกลุ่มควบคุมให้เข้มงวดขึ้น

### 5.7 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยชิ้นนี้ สามารถวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบลำดับสารพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตายในประชากรไทยได้สำเร็จ โดยพบความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างสูงจาก SnpEff จำนวน 7 ตำแหน่งจาก ตัวอย่างผู้เสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS 7 ราย โดยความแปรผันทางพันธุกรรมดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับกลุ่มอาการ SUNDS ในประชากรไทย ซึ่งควรทำการศึกษาทาง electrophysiological study เพื่อยืนยันผลกระทบต่อการทำงานของ sodium channel ต่อไป โดยข้อมูลที่ได้สามารถช่วยในการวินิจฉัยการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS และช่วยให้ญาติของผู้เสียชีวิตตระหนักถึงความเสี่ยงของการเสียชีวิตจากกลุ่มอาการ SUNDS ที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต



## รายการอ้างอิง

1. Tungsanga K, Sriboonlue P. Sudden Unexplained Death Syndrome in North-East Thailand. *International Journal of Epidemiology*. 1993;22:81-7.
2. Tatsanavivat P, Chiravatkul A, Klungboonkrong V, Chaisiri S, Jarerntanyaruk L, Munger RG, et al. Sudden and Unexplained Deaths in Sleep (Laitai) of Young Men in Rural Northeastern Thailand. *International Journal of Epidemiology*. 1992;21:904-10.
3. Tosukhowong P, Sriboonlue P, Tungsanga K, Bovornpadungkitti S, Chatuporn S, Muktahant B, et al. Potassium status of Northeast Thai constructors in three different geographic locations. *J Med Assoc Thai*. 2001;84:163-72.
4. Goh KT, Chao TC, Heng BH, Koo CC, Poh SC. Epidemiology of Sudden Unexpected Death Syndrome among Thai Migrant Workers in Singapore. *Int J epidemiol*. 1993;22:88-95.
5. Yanatatsaneejit P. Detection of scn5a gene mutation and linkage analysis study in scn5a ,kcnd2 and kcnd3 gene in sudden unexplained death syndrome families. Bangkok: Chulalongkorn University; 2001.
6. Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard T, Shimizu W, Aihara N, et al. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome *Hum Mol Genet*. 2002;11:337-45.
7. Banu LA, Najnin RA. Genetic and Clinical Aspects of Brugada Syndrome. *Acta Medica International*. 2015;2:112-7.
8. Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 2005;67:367-78.
9. Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL, Wilde AAM. Impact of Genetics on the Clinical Management of Channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62:169-80.
10. Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. Genomic Organization of the Human SCN5A Gene Encoding the Cardiac Sodium Channel. *GENOMICS*. 1996;34:9-16.

11. Andavan GS, Lemmens-Gruber R. Voltage-gated sodium channels: mutations, channelopathies and targets. *Curr Med Chem*. 2011;18:377-97.
12. Cheng J, Makielski JC, Yuan P, Shi N, Zhou F, Ye B, et al. Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome in Southern China. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2011;32:359-63.
13. Kaufenstein S, Kiehne N, Jenewein T, Biel S, Kopp M, König R, et al. Genetic analysis of sudden unexplained death: A multidisciplinary approach. *Forensic Science International*. 2013;229:122-7.
14. Liu C, Tester DJ, Hou Y, Wang W, Lv G, Ackerman MJ, et al. Is sudden unexplained nocturnal death syndrome in Southern China a cardiac sodium channel dysfunction disorder? *Forensic Science International*. 2014;236:38-45.
15. Borsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic science international Genetics*. 2015;18:78-89.
16. Campuzano O, Sanchez-Molero O, Allegue C, Coll M, Mademont-Soler I, Selga E, et al. Post-mortem genetic analysis in juvenile cases of sudden cardiac death. *Forensic Sci Int*. 2014;245:30-7.
17. Lahrouchi N, Raju H, Lodder EM, Papatheodorou E, Ware JS, Papadakis M, et al. Utility of Post-Mortem Genetic Testing in Cases of Sudden Arrhythmic Death Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:2134-45.
18. Zheng J, Zheng D, Su T, Cheng J. Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome: The Hundred Years' Enigma. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(5).
19. Qureshi A. Other Parasomnias In: Lee-Chiong TL, editor. *Sleep: A Comprehensive Handbook*. Canada: John Wiley & sons; 2006. p. 465-7.
20. Tang Y, Stahl-Herz J, Sampson BA. Molecular diagnostics of cardiovascular diseases in sudden unexplained death. *Cardiovascular Pathology*. 2014;23:1-4.
21. Liu C, Zhao Q, Su T, Tang S, Lv G, Liu H, et al. Postmortem molecular analysis of KCNQ1, KCNH2, KCNE1 and KCNE2 genes in sudden unexplained nocturnal death syndrome in the Chinese Han population. *Forensic Science International*. 2013;231:82-7.
22. Finkbeiner WE, Ursell PC, Davis RL. *Autopsy Pathology: a Manual and Atlas*. Second ed: Saunders; 2009.

23. Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, de Gouveia RH, Sheppard M, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2008;452:11-8.
24. Chugh SS, Teodorescu C, Evanado A, Reinier K. *Clinical Approach to Sudden Cardiac Death Syndromes*. first ed: Springer-Verlag London; 2010.
25. Karch SB. *Drug abuse handbook*: CRC press; 1998. 1288 p.
26. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, et al. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*. 2005;111:659-70.
27. Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, et al. MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2011;4:261-8.
28. Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MF. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res*. 2012;93:12-23.
29. Schroeter A, Walzik S, Blechschmidt S, Haufe V, Benndorf K, Zimmer T. Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:16-24.
30. Moric E. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace*. 2003;5(4):325-34.
31. Veerman CC, Wilde AA, Lodder EM. The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product Nav1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene*. 2015;573(2):177-87.
32. Catterall WA. Voltage-Gated Sodium Channels and Electrical Excitability of the Heart. In: Douglas P, Zipes JJ, William G. Stevenson, editor. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. seventh ed: Elsevier; 2018. p. 1-11.
33. Chockalingam P, Wilde A. The multifaceted cardiac sodium channel and its clinical implications. *Heart*. 2012;98(17):1318-24.
34. Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1854(10 Pt A):1502-9.

35. Abriel H. Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:2-11.
36. Lodder EM, Bezzina CR. Genomics of cardiac electrical function. *Brief Funct Genomics.* 2014;13:39-50.
37. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, et al. SCN5A Mutations Associated with an Inherited Cardiac Arrhythmia, Long QT Syndrome. *Cell.* 1995;80:805-11.
38. Keller D. A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507–1509, causing long QT syndrome: Role of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2003;35:1513-21.
39. Rook MB, Alshinawi CB, Groenewegen WA, van Gelder IC, van Ginneken ACG, Jongasma HJ, et al. Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovascular Research.* 1999;44:507-17.
40. Akai J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A, et al. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Letters.* 2000;479:29-34.
41. Maugeri IFS. Inherited arrhythmias database 2010 [updated December 22nd, 2010. Available from: <http://triad.fsm.it/cardmoc/>.
42. Tan H. Genetic control of sodium channel function. *Cardiovascular Research.* 2003;57:961-73.
43. Mardis E, McCombie WR. DNA sequencing. In: Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular cloning. 2. Fourth ed*: John Inglis; 2012. p. 735-892.
44. สุขนครทรัพย์ อ. *Electrocardiography for medical student. sixth ed*: ร้าน ทริค ซิงค์; 2006.
45. Pinnell J, Turner S, Howell S. Cardiac muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain.* 2007;7:85-8.
46. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-9.
47. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, et al. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium

channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2010;7:33-46.

48. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Cech M, et al.

The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W3-W10.

49. Golden Helix GenomeBrowse ® visualization tool (version 3.0) [software]. 3.0 ed. Bozeman, MT: Golden Helix, Inc. (<http://www.goldenhelix.com>).

50. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al.

A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.

51. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-2.

52. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310-5.

53. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al.

Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-91.

54. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.

55. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al.

ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1062-D7.

56. Consultation WHOE. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 2004;363(9403):157-63.

57. Kotta CM, Anastasakis A, Gatzoulis K, Manolis AS, Stefanadis C. Novel sodium channel SCN5A mutations in Brugada syndrome patients from Greece. *Int J Cardiol*. 2010;145(1):45-8.

58. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase.

*Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D158-D69.

59. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine MK, Losick R. *Molecular Biology of the Gene*: Pearson/Benjamin Cummings; 2008.
60. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA*. 2005;294(23):2975-80.
61. Shy D, Gillet L, Ogrodnik J, Albesa M, Verkerk AO, Wolswinkel R, et al. PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation*. 2014;130(2):147-60.
62. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2017;19(10):1105-17.
63. Kapplinger JD, Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Callis TE, Valdivia CR, et al. Enhanced Classification of Brugada Syndrome-Associated and Long-QT Syndrome-Associated Genetic Variants in the SCN5A-Encoded Na(v)1.5 Cardiac Sodium Channel. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2015;8(4):582-95.
64. Lupoglazoff JM, Cheav T, Baroudi G, Berthet M, Denjoy I, Cauchemez B, et al. Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block. *Circ Res*. 2001;89(2):E16-21.
65. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res*. 2003;93(9):821-8.
66. Viswanathan PC, Benson DW, Balser JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest*. 2003;111(3):341-6.
67. Ye B, Valdivia CR, Ackerman MJ, Makielski JC. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics*. 2003;12(3):187-93.
68. Wang Q, Chen S, Chen Q, Wan X, Shen J, Hoeltge GA, et al. The common SCN5A mutation R1193Q causes LQTS-type electrophysiological alterations of the cardiac sodium channel. *J Med Genet*. 2004;41(5):e66.

69. Makarawate P, Chaosuwannakit N, Vannaprasaht S, Sahasthas D, Koo SH, Lee EJD, et al. SCN5A Genetic Polymorphisms Associated With Increased Defibrillator Shocks in Brugada Syndrome. J Am Heart Assoc. 2017;6(6).







ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio

| Target ID                                      | Start Position | End Position | ULSO Sequence                   | DLSO Sequence                    | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|--|----------------|--------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453777)_172071361 | 38595765       | 38596045     | ACAATACACTCGCCTGTG<br>AAGATGG   | CTGCTTGGTCACAATGTC<br>GAATATGAAG | +            | 0.853        | 174                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453777)_172071362 | 38595765       | 38596045     | TTGGCCAAGATCAACCTG<br>CTCTTTGTG | AAGTCAGCTGGACGGAGA<br>AGCCCTCCC  | -            | 0.853        | 173                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453777)_172071363 | 38595765       | 38596045     | TTTGGGCTCACTAGAGGG<br>TAGAGTGG  | CCTTTGACGTCACCATCAT<br>GTTTCTGA  | -            | 0.853        | 190                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453778)_172071364 | 38620820       | 38620991     | CCTGGAATCCGGAGGGGC<br>CTCT      | TGCTTCATGGGGCCTCC<br>ATCTCACT    | +            | 0.701        | 190                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453778)_172071365 | 38620820       | 38620991     | AATCCAGCCTGTGTCGG<br>GTGGC      | ATGCCTTGTCCCTGAAG<br>CCAGCT      | -            | 0.701        | 189                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453779)_172071366 | 38655229       | 38655562     | TAACAAGGAAATTCACA<br>CACGAGACA  | TTTTAGAGCTTCAGGACT<br>CTGAAAGT   | +            | 0.967        | 183                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453779)_172071367 | 38655229       | 38655562     | GTGTGTCCTATTGGTG<br>TGTTGTCA    | ATCAGGTTAAACACCAAG<br>GCTAGAGGG  | -            | 0.967        | 182                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                                      | Start Position | End Position | ULSO Sequence                   | DLSO Sequence                      | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|--|----------------|--------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453779)_172071368 | 38655229       | 38655562     | AAGGGAGAGGGCTGGTCGG<br>GGAGGGC  | CTATTTAGTTATCCACGGT<br>AAGATGC     | -            | 0.967        | 178                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453780)_172071369 | 38691017       | 38691169     | CTCACCTGCTGGTCCCGGG<br>CC       | CTGTTGGGCTCCCGGGCTG<br>GGCA        | +            | 0.602        | 184                |
| SCN5A + SCN5A_UserDefined (52453780)_172071370 | 38691017       | 38691169     | AAGCAGCAGCCGCCACCCC<br>GGGGC    | TGCGTGCTCCTCCCTGCCCC<br>GGGTCCGGCC | -            | 0.602        | 175                |
| SCN5A_Exon (48618200)_172071460                | 38671802       | 38671920     | ATGGTCTTGCCTTATTTCAG<br>TACGATG | GGGGAAGGGAGGCTGCCAG<br>CACATTT     | +            | 0.88         | 186                |
| SCN5A_Exon (48618200)_172071461                | 38671802       | 38671920     | TAATGCTACTGTCTGTCCCC<br>AGACTT  | TTGCAGTTAATACCTGCTGA<br>GTACCC     | -            | 0.88         | 174                |
| SCN5A_Exon (48618202)_172071462                | 38627182       | 38627532     | GATCCACTTCCACAGAGGA<br>TGCGGAA  | AACACGATGATGGTAGCAC<br>CAGT        | +            | 0.734        | 172                |
| SCN5A_Exon (48618202)_172071463                | 38627182       | 38627532     | GGACTTCTTTCATGCCTTCC<br>TCATCAT | CCAAGGCCACACACACACC<br>AT          | -            | 0.734        | 173                |
| SCN5A_Exon (48618202)_172071464                | 38627182       | 38627532     | TTCACAAGTCCCCTCCTCT<br>TCCTCCTT | ATCTTTGCTGTGGTGGGCAT<br>GCAGCTC    | -            | 0.734        | 178                |
| SCN5A_Exon (48618204)_172071465                | 38639220       | 38639458     | GATGGTGAGGTCAGTAAACG<br>GGTCCAT | ACAGCCAATGAGTTAGTTTG<br>ATTCTGT    | +            | 0.88         | 181                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                           | Start Position | End Position | ULSO Sequence                     | DLSO Sequence                    | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|-------------------------------------|----------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ Exon<br>(48618204)_172071466 | 38639220       | 38639458     | ATCAAGCAGGGAGTGAAGTTG<br>GTGGT    | CTGCCTGCAGCTGGCTCTCA<br>AA       | -            | 0.88         | 176                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618210)_172071467 | 38645203       | 38645574     | CAGTGCTGTTCTTTTGGCCATG<br>GAG     | TCAGAACCAGGTCTCGCCT<br>GCGAAA    | +            | 0.787        | 190                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618210)_172071468 | 38645203       | 38645574     | GAACCTCGGCTCCTGGCCACG<br>C        | AGCCCCGAGATGCAGGCACC<br>AC       | -            | 0.787        | 184                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618210)_172071469 | 38645203       | 38645574     | ATGAAGAGCACATGTCATGGT<br>CGTGT    | GCAAGATTTGCAGATGATGA<br>AAACAGC  | -            | 0.787        | 176                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618212)_172071470 | 38649642       | 38649705     | TAGTGAGGTCTCCACCTCCCCA<br>GAGC    | ACCTACCACCCCGGGTCTCC<br>TT       | -            | 0.602        | 186                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618214)_172071471 | 38597147       | 38597251     | TCTGAGAACCCAGAAATGAGG<br>TTGGTG   | AGGCTCCTGGTTTTGTGGGA<br>GT       | -            | 0.8          | 175                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618220)_172071472 | 38597932       | 38598069     | AATGACAAAATAGATGTACATG<br>TAGAGGT | TGTCCATTCTGTGGGAAAAGA<br>GGGTGTA | +            | 0.701        | 181                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618220)_172071473 | 38597932       | 38598069     | TATGAAGAGCAGCCTCAGTGG<br>GAATAC   | CAGCTCCCACCTGGGCTGGG<br>TA       | -            | 0.701        | 173                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618222)_172071474 | 38647442       | 38647639     | TGCGACCACGGCCAGGATCAG<br>GTTCA    | ATGGCATTTCGAAGTCACCT<br>AGTCTAG  | +            | 0.8          | 177                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                           | Start Position | End Position | UILSO Sequence                  | DLSO Sequence                   | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|-------------------------------------|----------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ Exon<br>(48618222)_172071475 | 38647442       | 38647639     | TTGTCACTTCTGGGGTCCCTT<br>CTACCT | AGTGCCACCGAGGAGCCTCT<br>AAGCC   | -            | 0.8          | 190                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618226)_172071476 | 38640409       | 38640541     | TCAGCATCTGGGCCCGCCTG<br>GCTCCT  | CACAGGGATAGGATGAAGGT<br>CTTGATG | +            | 0.8          | 173                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618226)_172071477 | 38640409       | 38640541     | TGATTGCACTCAGACCACGCCA<br>TCG   | AACCCAGGTCATTTAAGCA<br>CCCCC    | -            | 0.8          | 177                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618228)_172071478 | 38648160       | 38648301     | CGTGGTCGGGTTCTGCCTG<br>CCTTTA   | ACAGCTCAGTGAAGCTGAGC<br>TTCACAA | +            | 0.701        | 185                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618228)_172071479 | 38648160       | 38648301     | ACATGTCCGGAGGGCTACCGG<br>TGC    | CCCACAAGGGACAGCAAGTG<br>TG      | -            | 0.701        | 174                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618230)_172071480 | 38651225       | 38651455     | GTTGGCAGCGCACTTGTGCCTT<br>AGGTT | CAAGCACGGGGTCACCCAGG<br>GGCA    | +            | 0.701        | 186                |
| SCN5A_ Exon<br>(48618230)_172071481 | 38651225       | 38651455     | TCATCGGCTGCAGCTCTTCAT<br>GGG    | TCTGCAGCTGGGGAAGACTT<br>TGTGA   | -            | 0.701        | 175                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790098)_172071485 | 38618152       | 38618272     | GTGCTGCCCTGGAGCAACTG<br>TCCTCT  | CCTGGGACCTGCACAGAGCC<br>ACTTTT  | +            | 0.701        | 188                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790098)_172071486 | 38618152       | 38618272     | TGTCCACACCCCTGTCCATAG<br>ACCC   | GGCAGCCCTTGCCTTAGCC<br>TC       | -            | 0.701        | 176                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                           | Start Position | End Position | ULSO Sequence                     | DLSO Sequence                   | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|-------------------------------------|----------------|--------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ Exon<br>(52790100)_172071522 | 38607900       | 38608073     | TGAGCAGCATCTCCAGCACGA<br>AGACATAT | CCGATTCCACCCCTGCACCAG<br>GCA    | +            | 0.781        | 171                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790100)_172071523 | 38607900       | 38608073     | GCTTGAGTATGCCGACAAGAT<br>GTTCA    | AAGGGAACAGGAGGAGAAA<br>CCCATT   | -            | 0.781        | 170                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790101)_172071524 | 38646220       | 38646399     | TGCTTCTTCTCTCATGGCTGTT<br>TACTG   | CCAGGCAACTCTCAGTGACT<br>TGGTTTT | +            | 0.88         | 185                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790101)_172071525 | 38646220       | 38646399     | TCCTTGGAGATGCCCTTTGG<br>CC        | AGCTGTGGTTCTAGCTTTTC<br>CAGGG   | -            | 0.88         | 174                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790102)_172071526 | 38628891       | 38629064     | CCCTGTTGGAAGTAGTAGTAG<br>GGGT     | TCCCTCCAGGGCTGCCAGCT<br>CTGATT  | +            | 0.701        | 190                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790102)_172071527 | 38628891       | 38629064     | AGATGACCTTCAAGATCATTGC<br>CCTC    | ACCCACTGCATGGGGGATGG<br>TGG     | -            | 0.701        | 184                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790103)_172071528 | 38616788       | 38616942     | GGGCCTGTGTGGTGTCCACCG<br>CACA     | TGATGGGGGTGGCGAACAGG<br>GCAATAT | +            | 0.701        | 181                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790103)_172071529 | 38616788       | 38616942     | ATAGGCTGTGCCGGCGCTGT<br>CCCTG     | TCCTGGGGATGCAGGGTTGT<br>GGC     | -            | 0.701        | 188                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790104)_172071530 | 38603906       | 38604028     | ATCTCCCCATTCTACTTTGC<br>CTCCC     | TGGCTGCCCTCCACCACAGGG<br>AGT    | -            | 0.8          | 187                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                          | Start Position | End Position | ULSO Sequence                   | DLSO Sequence                     | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|------------------------------------|----------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_Exon<br>(52790105)_172071531 | 38598722       | 38598775     | TTCATCTGCCAGACCAGAGCC<br>CTAAG  | ACAGTGGCTTCTCCACCAA<br>GTC        | -            | 0.8          | 171                |
| SCN5A_Exon<br>(52790106)_172071532 | 38663891       | 38663980     | TGGCCGGCCCATGCTGCTCAG<br>CTT    | CTCTTCTCCACGTGGCCCCC<br>TC        | -            | 0.602        | 170                |
| SCN5A_Exon<br>(52790108)_172071533 | 38601638       | 38601919     | ACTCACACTGGCTCTTGTGTT<br>CAC    | GTTTCATGATGGACGGGATGG<br>CG       | +            | 0.841        | 170                |
| SCN5A_Exon<br>(52790108)_172071534 | 38601638       | 38601919     | GGAGACTTGCCTTTGAACTACA<br>CCAT  | TGGAGAGAAGGGACTTCCTT<br>CCTCC     | -            | 0.841        | 174                |
| SCN5A_Exon<br>(52790108)_172071535 | 38601638       | 38601919     | TGCAGCCAGGGAGTTCATTCTT<br>TCTT  | TCCTCCTCGTCTGCCTCATC<br>TTCTG     | -            | 0.841        | 174                |
| SCN5A_Exon<br>(52790109)_172071536 | 38662334       | 38662462     | GACCAGAGACTCAAAGGTGTA<br>AATGGC | GCTCTCTGCAATGCCCCCAT<br>GGCAGA    | +            | 0.8          | 182                |
| SCN5A_Exon<br>(52790109)_172071537 | 38662334       | 38662462     | TCTCCTGCCAGGTACACCTTC<br>AC     | TCTCATTTGCTATGCTGTGC<br>TATGCC    | -            | 0.8          | 174                |
| SCN5A_Exon<br>(52790110)_172071538 | 38622422       | 38622862     | CCCCGGGGTGCCCTGGCCTG<br>GTTGCT  | GCCCGTCCGCAGGAGACCA<br>CAGCAGAAAT | +            | 0.691        | 186                |
| SCN5A_Exon<br>(52790110)_172071539 | 38622422       | 38622862     | TTGTTTCATCTCTGTCTCAT<br>CAGGG   | GAAACTGAGGCCCAGAGACC<br>TTTAAGA   | +            | 0.691        | 187                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                                   | Start Position | End Position | ULSO Sequence                     | DLSO Sequence                     | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|---|----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ Exon<br>(52790110)_172071540         | 38622422       | 38622862     | AAGGAAACACGGTTTGAGGAA<br>GGC      | CCTCACCCCTGCATGTATAA<br>GGC       | -            | 0.691        | 188                |
| SCN5A_ Exon<br>(52790110)_172071541         | 38622422       | 38622862     | TCCTTCAGTGCAGACAACCTCA<br>CAG     | TCAGAAAGCCCGCAGCCCTTG<br>CCGCCCA  | -            | 0.691        | 173                |
| SCN5A_ FiveUtrExon<br>(52453494)_172071482  | 38674526       | 38674850     | CAGCTTTTGGAGGCCTGCAG<br>GT        | CTGCGAAGCTGCTGGTGCC<br>CCGAGGTAAT | +            | 0.668        | 178                |
| SCN5A_ FiveUtrExon<br>(52453494)_172071483  | 38674526       | 38674850     | AGGAGGAGGCTCCCGGCCCC<br>AGCTG     | TCCAGCCCTGCCTACCCCTTC<br>TGT      | -            | 0.668        | 170                |
| SCN5A_ FiveUtrExon<br>(52453494)_172071484  | 38674526       | 38674850     | TGCTCTGTCCCTGGGCATAG<br>AATC      | TTCACACGGGAGTCCCTGGC<br>AGCCATC   | -            | 0.668        | 174                |
| SCN5A_ ThreeUtrExon<br>(52790099)_172071487 | 38589553       | 38593049     | TAGACCAGTTCATGTAAGCCAT<br>TTATTGG | GCAGTTCTGGAATTAATAA<br>GGTGACAGC  | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ ThreeUtrExon<br>(52790099)_172071488 | 38589553       | 38593049     | CCGTCTGCAGCCAGCCCCAGG<br>CACCTGT  | ACCCAGGAGGGGCACATACC<br>TCTCCAA   | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ ThreeUtrExon<br>(52790099)_172071489 | 38589553       | 38593049     | GCAAAGCATGGAGATCTACAA<br>AAATAGG  | CCACCAAGGAACTGGGGTG<br>ACAAGAA    | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ ThreeUtrExon<br>(52790099)_172071490 | 38589553       | 38593049     | ACATAACTTTTACTCGCCGGC<br>AATGC    | GTGGAGGGCTCCATGGGA<br>GAGCTGGAAT  | +            | 0.777        | 171                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                               | Start Position | End Position | ULSO Sequence                     | DLSO Sequence                     | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|---|----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071491 | 38589553       | 38593049     | GCTCAGGCTTGCCAGTTGAC<br>CCTGTGA   | TTTTCACAAAGACCTATGGGA<br>CCACCT   | +            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071492 | 38589553       | 38593049     | TGGGTGCCATCAGGATCCCGG<br>GCTGA    | CAAGCTCCGCTCCCACTCC<br>CATGTCT    | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071493 | 38589553       | 38593049     | AAACTCCTCCGCTATGGTCCA<br>GAGA     | CTGGCAGGGCCTGCCAGGT<br>TCCAGGA    | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071494 | 38589553       | 38593049     | GGGGCTTGACCCCTTGTTCC<br>TTTTGTTTT | ACCTGCGTGAAAAACACAGGG<br>GGAAAAAT | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071495 | 38589553       | 38593049     | ACCTTGGAGACAATAGGGGC<br>CAGAGT    | GTGTGTGCTTGTGTGAGTGG<br>GGTTCA    | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071496 | 38589553       | 38593049     | CCCCATTGACCCCTGGGCAG<br>TGAAGA    | AAAAATCCTTAGTTCCTTTC<br>TCAAGTAAA | +            | 0.777        | 173                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071497 | 38589553       | 38593049     | GCCCATTCACAACATATACAGT<br>CTCAG   | GCTGTCCACGGCGGCCACA<br>GAACTCT    | +            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071498 | 38589553       | 38593049     | TGATCCGGGGGCTGAGGCC<br>ATTTCTTA   | TGGACTCAGGTCCTGTCC<br>GGAGAA      | +            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071499 | 38589553       | 38593049     | GTCCGGGAGATCTCACTGTG<br>GCTGTA    | GTTCTCACTCATCAGGTAGG<br>CGATGA    | +            | 0.777        | 170                |



ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                               | Start Position | End Position | ULSO Sequence                     | DLSO Sequence                    | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|---|----------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071500 | 38589553       | 38593049     | CTGCCCCCTGCTGACGGAAG<br>AGGAA     | TTGGATGGGTTGGCTGCCAT<br>GAACCTT  | +            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071501 | 38589553       | 38593049     | GAAGGCAAGAGAATGTCCATG<br>CAATG    | AATAAACTGAGTGGCCTCTG<br>GGTCAA   | +            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071502 | 38589553       | 38593049     | CGTGGCACGCTGAAGTTCTCC<br>AGGAT    | GGTGCAGTAGGGCGGCC<br>CAGTGTT     | +            | 0.777        | 174                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071503 | 38589553       | 38593049     | CTGGAAGTTGAACATGTCGTCG<br>ATG     | CCCTTGGCCCCCTCGGATCAG<br>TCTGA   | +            | 0.777        | 185                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071504 | 38589553       | 38593049     | CACTTCTACCAAACTTCATGT<br>ATAAATAA | TGGGAACTTGCTGAGAGA<br>GCATAAC    | -            | 0.777        | 188                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071505 | 38589553       | 38593049     | TTTGTGTGTGGACAGCCCGG<br>GAGCTTTG  | AATGACCAGCAGGAGGGAA<br>GGACAGACA | -            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071506 | 38589553       | 38593049     | AGTCCAGTGTGGACACGCGTTT<br>AACTG   | AATGCGGTTGGGAGGCAGG<br>TCGGGCTG  | -            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071507 | 38589553       | 38593049     | TAACTACCTCGCCGAGCTGC<br>GGAGGGC   | GATCTAGTTCTCTTCTCCTG<br>TGTTCCCT | -            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071508 | 38589553       | 38593049     | GCTGACAATCCTATTAGCATA<br>TGCAAAAT | TCCCAGGCACCTCAGTCTC<br>AC        | -            | 0.777        | 171                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                               | Start Position | End Position | ULSO Sequence                     | DLSO Sequence                      | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|---|----------------|--------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071509 | 38589553       | 38593049     | AATGAACCATGGCACCTTTGA<br>GAGAGGG  | TTTTCAGGGAAAAATATTTTA<br>CTAGTCCAA | -            | 0.777        | 172                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071510 | 38589553       | 38593049     | TGAAGAGAGGAAACTGGCGAT<br>CTCCCA   | TCAGGCCAGTTCTCGTGCC<br>CTTA        | -            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071511 | 38589553       | 38593049     | CCTTTTCTCCCTCCTGTAAG<br>AGTATTA   | ATGGGGTTTGGGGCTAAGA<br>AGTTCAC     | -            | 0.777        | 173                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071512 | 38589553       | 38593049     | AGACAGGCCTTCCCTGCCGG<br>CCCCC     | TTCCAGAGGAGAGTGGCCTG<br>GGTCCCAG   | -            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071513 | 38589553       | 38593049     | AGCCGGAAGTGTCTCAAA<br>GCA         | ACAGTCTCACACACGGAGG<br>CCAGAC      | -            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071514 | 38589553       | 38593049     | TCCCAGCTGTGAGGCGAAAT<br>ATAAA     | CTCTTCTTAACCCCTGAACAA<br>GAGTGCTA  | -            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071515 | 38589553       | 38593049     | CCTAAATGCAGTCAGTCACAA<br>ACCAG    | AGATAGACCTGTGACCTGGT<br>CTGGTC     | -            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071516 | 38589553       | 38593049     | TATGACAGTGTCACTAGAGCC<br>ACCAGCGA | CACACTGAAAAGCAGCCTTT<br>TTCACC     | -            | 0.777        | 171                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071517 | 38589553       | 38593049     | TGCAACGCTCTTTGAAGCATG<br>CCT      | TCCTCCATCTCCTCCACTTCC<br>TTC       | -            | 0.777        | 170                |

ตารางที่ 13 แสดง Truseq CAT probe สำหรับ SCN5A ที่ออกแบบโดยใช้ Designstudio (ต่อ)

| Target ID                               | Start Position | End Position | ULSO Sequence                    | DLSO Sequence                    | Probe Strand | Design Score | Expected Size (bp) |
|---|----------------|--------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071518 | 38589553       | 38593049     | ACCTGCCCATGGTGAGTGGGG<br>ACCGC   | ATCTCCTACGAGCCCCATCACCA<br>CCACA | -            | 0.777        | 170                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071519 | 38589553       | 38593049     | CATCGTGGTCAACATGTACATT<br>GCCAT  | TATTCGGTCTGTGACTTTG<br>CCGAT     | -            | 0.777        | 175                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071520 | 38589553       | 38593049     | AACTTCGCTTATGTCAAGTGGG<br>AGGCTG | ACTCTGCCCCAACAGCAATGGCT<br>CTCGG | -            | 0.777        | 186                |
| SCN5A_ThreeUtrExon (52790099)_172071521 | 38589553       | 38593049     | ACCAGTAGCCACAGTCTCTGTT<br>GTTTC  | ATCCGCACGGCTGCTCTTTGCC<br>TCA    | -            | 0.777        | 171                |

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตาย

| ID  | Start    | Stop     | Exon | dbSNP       | Ref | Alt | Mutation CDS | Mutation AA  | Type | Type of variant | SnPEff | Polyphen-2/<br>Mutationtaster | Clinvar                | CADD score |
|-----|----------|----------|------|-------------|-----|-----|--------------|--------------|------|-----------------|--------|-------------------------------|------------------------|------------|
| T01 | 38647543 | 38647543 | 10   | rs199473110 | C   | T   | c.1237G>A    | p.Ala413Thr  | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | not provide            | 27.8       |
| T01 | 38622760 | 38622760 | 17   | Ref. (62)   | C   | T   | c.2890G>A    | p.Ala964Thr  | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | Uncertain significance | 26         |
| T01 | 38601698 | 38601698 | 23   | Novel       | C   | T   | c.4185G>A    | p.Trp1395*   | snp  | Stop gained     | H      | Disease causing               | NA                     | 45         |
| T03 | 38627251 | 38627251 | 16   | Novel       | G   | T   | c.2718C>A    | p.Cys906*    | snp  | Stop gained     | H      | Disease causing               | NA                     | 40         |
| T11 | 38674734 | 38674734 | 2    | Novel       | G   | -   | c.65delC     | p.Ala22fs    | del  | Frameshift      | H      | Disease causing               | NA                     | 33         |
| T11 | 38639449 | 38639449 | 14   | Novel       | T   | C   | c.2033A>G    | p.Glu678Gly  | snp  | Missense        | M      | Possibly damaging             | NA                     | 26.3       |
| T11 | 38627331 | 38627331 | 16   | Novel       | G   | A   | c.2638C>T    | p.His880Tyr  | snp  | Missense        | M      | Possibly damaging             | NA                     | 27.3       |
| T11 | 38627291 | 38627291 | 16   | rs199473172 | C   | A   | c.2678G>T    | p.Arg893Leu  | snp  | Missense        | M      | Possibly damaging             | Pathogenic             | 34         |
| T11 | 38591817 | 38591817 | 28   | rs762981322 | C   | T   | c.6046G>A    | p.Val2016Met | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | Uncertain significance | 25.2       |
| T13 | 38647519 | 38647519 | 10   | Novel       | G   | C   | c.1261C>G    | p.Gln421Glu  | snp  | Missense        | M      | Possibly damaging             | NA                     | 23.8       |

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มการเสียชีวิตชนิดไหลตาย (ต่อ)

| ID  | Start    | Stop     | Exon | dbSNP       | Ref | Alt | Mutation CDS | Mutation AA  | Type | Type of variant | SnpEff | Polyphen-2/<br>Mutationtaster | Clinvar | CADD score |
|-----|----------|----------|------|-------------|-----|-----|--------------|--------------|------|-----------------|--------|-------------------------------|---------|------------|
| T13 | 38647452 | 38647452 | 10   | Novel       | T   | A   | c.1328A>T    | p.Lys443Ile  | snp  | Missense        | M      | Possibly damaging             | NA      | 32         |
| T16 | 38662433 | 38662433 | 5    | Novel       | T   | C   | c.512A>G     | p.Glu171Gly  | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | NA      | 29.5       |
| T16 | 38645298 | 38645298 | 12   | rs779691420 | C   | T   | c.1795G>A    | p.Gly599Arg  | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | NA      | 31         |
| T25 | 38651256 | 38651256 | 7    | Ref.(57)    | C   | T   | c.903G>A     | p.Trp301*    | snp  | Stop gained     | H      | Disease causing               | NA      | 37         |
| T27 | 38671919 | 38671919 | 3    | Novel       | G   | T   | c.275C>A     | p.Thr92Asn   | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | NA      | 27         |
| T27 | 38592928 | 38592928 | 28   | Novel       | C   | -   | c.4935delG   | p.Leu1646fs  | del  | Frameshift      | H      | Disease causing               | NA      | 22.8       |
| T27 | 38591826 | 38591826 | 28   | Novel       | C   | T   | c.6037G>A    | p.Glu2013Lys | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | NA      | 27.4       |
| T33 | 38592454 | 38592454 | 28   | Novel       | T   | -   | c.5409delA   | p.Glu1804fs  | del  | Frameshift      | H      | Disease causing               | NA      | 23.4       |
| T34 | 38616836 | 38616836 | 20   | Novel       | C   | T   | c.3618G>A    | p.Trp1206*   | snp  | Stop gained     | H      | Disease causing               | NA      | 45         |
| T42 | 38662413 | 38662413 | 5    | Novel       | C   | T   | c.532G>A     | p.Ala178Thr  | snp  | Missense        | M      | Probably damaging             | NA      | 34         |

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของ exon บนยีน SCN5A ในกลุ่มควบคุม

| ID  | Start    | Stop     | Exon | dbSNP       | Ref | Alt | Mutation CDS | Mutation AA  | Type | Effect by type | SnpEff | Polyphen-2/<br>Mutationtaster | ClinVar                | CADD score |
|-----|----------|----------|------|-------------|-----|-----|--------------|--------------|------|----------------|--------|-------------------------------|------------------------|------------|
| C16 | 38627472 | 38627472 | 16   | rs45475899  | C   | T   | c.2497G>A    | p.Gly833Arg  | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | Uncertain significance | 34         |
| C20 | 38592940 | 38592940 | 28   | Novel       | C   | G   | c.4923G>C    | p.Lys1641Asn | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | NA                     | 27.5       |
| C28 | 38592894 | 38592894 | 28   | Novel       | G   | T   | c.4969C>A    | p.Leu1657Ile | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | NA                     | 25.6       |
| C30 | 38592947 | 38592947 | 28   | Novel       | C   | T   | c.4916G>A    | p.Gly1639Glu | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | NA                     | 25         |
| C30 | 38622539 | 38622539 | 17   | Novel       | G   | -   | c.3111delC   | p.Thr1038fs  | del  | Frameshift     | H      | Disease causing               | NA                     | 27.6       |
| C32 | 38592897 | 38592897 | 28   | Novel       | C   | G   | c.4966G>C    | p.Ala1656Pro | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | NA                     | 27.6       |
| C34 | 38592083 | 38592083 | 28   | Novel       | A   | T   | c.5780T>A    | p.Leu1927His | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | NA                     | 25.7       |
| C36 | 38592534 | 38592534 | 28   | rs199473314 | C   | T   | c.5329G>A    | p.Val1777Met | snp  | Missense       | M      | Probably damaging             | Likely pathogenic      | 30         |

SnpEff: M: Moderate, H: High, Polyphen-2: Probably damaging, possibly damaging, Mutationtaster: Disease causing

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

### 1. ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสาวรัชติพรรณ ปิติวรารมย์

วัน/เดือน/ปีเกิด 17 พฤศจิกายน พ.ศ. 2534

ที่อยู่ 521 ถนนประชาราษฎร์บำเพ็ญ แขวงห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310

Email address silverbell\_twin@hotmail.com,

Rachtipan.pi@student.chula.ac.th

### 2. ประวัติการศึกษา

การศึกษา

1. วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2553-2556

2. นิติศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช พ.ศ. 2557-2559

ปัจจุบันกำลังศึกษาในหลักสูตร

1. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2557-ปัจจุบัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY