บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1*

จากข้อมูลการวิเคราะห์การเปลี่ยนลำดับเบสในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1* สามารถสรุปการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 10)

1. โพลิมอร์ฟิซึม

ยีน *MSX1*

- A30A เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ silent mutation การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และกรดอะมิโนตำแหน่ง 30 ไม่ได้อยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่ที่สำคัญ
- A34G เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ missense mutation เปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 34 แต่ไม่น่ากระทบต่อโครงสร้างของโปรตีน แม้ตำแหน่งดังกล่าวจะอยู่ใน conserve region แต่ไม่ได้อยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่ที่สำคัญ และพบอัลลีลดังกล่าวในคนปกติ จากการรายงานของ Jezewski P และคณะ (2003)
- G110G เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ silent mutation การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และกรดอะมิโนตำแหน่ง 110 ไม่ได้อยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่ที่สำคัญ นอกจากนี้พบอัลลีลดังกล่าวในคนปกติ จากการรายงานของ Suzuki Y และคณะ (2004)
- P147Q เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ missense mutation ซึ่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 147 น่าจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน และตำแหน่งดังกล่าวอยู่ใน conserve region ซึ่งตำแหน่งนี้อยู่ด้าน N-terminal ของ homeodomain เล็กน้อย เราเรียกตำแหน่งนี้ว่า extended homeodomain (EHD) อย่างไรก็ตามการตรวจหาอัลลีลดังกล่าวในคนปกติ พบอัลลีลนี้ถึง 6/120 โครโมโซม
- 452-14delT เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ deletion ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นที่ intron และตำแหน่งนี้ไม่เคยมีรายงานความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ exon splicing
- 894+6C>T เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ substitution mutation ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโน เนื่องจากอยู่ในส่วนของ 3'UTR และพบอัลลีลดังกล่าวในคนปกติ จากการรายงานของ Suzuki Y และคณะ (2004)

ยีน *PVRL1*

- 854+15G>T เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ missense mutation ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนของกรดอะมิโน เนื่องจากอยู่ใน intron และไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องของตำแหน่งดังกล่าวกับกระบวนการ exon splicing

- E445ins เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ insertion ที่ส่งผลให้กรดอะมิโนเพิ่มขึ้นมา 1 ตัว การเพิ่มดังกล่าวไม่น่าจะส่งผลต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน และมีรายงานการพบอัลลีลนี้ในคนปกติจากฐานข้อมูล NCBI และตำแหน่งดังกล่าวไม่ได้อยู่ใน conserve region

2. การกลายพันธุ์

ยีน *MSX1*

- G267C เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ missense mutation ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 267 อาจจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติไม่พบอัลลีลนี้ในการตรวจทั้ง 200 โครโมโซม และตำแหน่งดังกล่าวอยู่ใน exon 2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าใน exon นี้จะมี regulatory element อยู่ เนื่องจากมีการพบการกลายพันธุ์ใน exon 2 น้อยกว่า ใน exon 1 อย่างมีนัยสำคัญ (Jezewski P *et al.*) แม้ว่าตำแหน่งนี้จะไม่อยู่ใน conserve region

- P278S เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ missense mutation ซึ่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 278 อาจจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติไม่พบอัลลีลนี้ในการตรวจทั้ง 200 โครโมโซม และตำแหน่งดังกล่าวอยู่ใน exon 2 เช่นเดียวกับที่กล่าวในตำแหน่ง 267 คาดว่าตำแหน่งนี้น่าจะมี regulatory element อยู่ รวมทั้งเป็นตำแหน่งที่อยู่ใน conserve region

ยีน *PVRL1*

- V396M เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสแบบ missense mutation ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 396 ไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน แต่การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติไม่พบอัลลีลนี้ในการตรวจทั้ง 400 โครโมโซม และตำแหน่งนี้อยู่ใน conserve region

ตารางที่ 11 สรุปการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *PVRL1* และยีน *MSX1* ในผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการชาวไทย

Nucleotide position	Nucleotide change	Expected amino acid change	M or P	Hetero Zygous (patient)	Homo Zygous (patient)	Known or novel	Enz	Allele frequency in controls
MSX1								
Exon 1								
90	C>A	A30A	P	0/100	2/100	K[1]	-	ND
101	C>G	A34G	P	4/100	4/100	K[2]	-	ND
330	C>T	G110G	P	15/100	15/100	K[2]	-	ND
440	C>A	P147Q	P	3/100	0/100	K[2]	*Dde* I	6/120
Intron 1								
452-14	del T	-	P	8/100	0/100	N	-	ND
Exon 2								
799	G>T	G267C	M	1/100	0/100	N	*Dde* I	0/200
832	C>T	P278S	M	1/100	0/100	N	*Mwo* I	0/200
3'UTR								
894+6	C>T	-	P	0/100	1/100	K[2]	-	ND
PVRL1								
Intron 4								
854+15	G>T	-	P	3/100	0/100	N	-	ND
Exon 6								
1186	G>A	V396M	M	1/181	0/181	N	*Pml* I	0/400
1335	insGAG	E445ins	P	5/100	0/100	K[2]	-	5/200

M : การกลายพันธุ์, P : โพลิมอร์ฟิซึม, [1] : Jezewski และคณะ (2003), [2] : Suzuki และคณะ (2004) M : การกลายพันธุ์, P : โพลิมอร์ฟิซึม

อภิปรายผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1*

โรคที่มีสาเหตุจากปัจจัยหลายอย่าง (multifactorial) เช่น ความผิดปกติของหลอดประสาท โรคหัวใจแต่กำเนิด และปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ ในปัจจุบันยังไม่สามารถศึกษาถึงสาเหตุที่ชัดเจนได้ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาด้านสิ่งแวดล้อมหรือด้านพันธุกรรม จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีที่ทำให้การศึกษาในด้านนี้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในปี 2003 มีการศึกษาในยีน *MSX1* ในผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ พบว่าการกลายพันธุ์ในยีนนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคประมาณ 2% การศึกษานี้นับเป็นการศึกษาแรกที่พบว่าโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียงยีนเดียว (single gene disorder) ต่อมาในปี 2004 มีผู้ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาในปี 2003 แต่ในผู้ป่วยต่างเชื้อชาติกัน พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในกลุ่มแรก คือพบการกลายพันธุ์ประมาณ 2% ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในยีน *MSX1* เห็นได้ว่าการศึกษาด้วยวิธีนี้แม้ต่างเชื้อชาติก็ยังคงให้ผลไม่ต่างกัน ซึ่งต่างจากการศึกษา association study, linkage analysis และ linkage disequilibrium อย่างไรก็ตามการศึกษาการกลายพันธุ์ในยีนที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ ต้องมีวิธีเลือก candidate gene ที่เหมาะสม ซึ่งต้องอาศัยข้อมูลจากการศึกษา association study, linkage analysis, linkage disequilibrium การศึกษาในสัตว์ทดลอง รวมทั้งข้อมูลของยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดปากแหว่งเพดานโหว่ร่วมกับกลุ่มอาการในคนด้วย

ในปัจจุบันมีการค้นพบยีนที่เป็นสาเหตุของโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการประมาณ 30 ยีน โดยมีประมาณ 10 ยีนที่มีการศึกษา association study หรือ linkage analysis หรือ linkage disequilibrium แล้ว แสดงผลสนับสนุนต่อการเกิดโรค ตัวอย่างของยีนดังกล่าว เช่น *MSX1*, *PVRL1*, *CLPTM1* และ *IRF6* โดยยีน *MSX1* และ *IRF6* มีผู้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์แล้ว แต่ในยีน *IRF6* ไม่พบการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคพบเพียงโพลิมอร์ฟีซึม ต่อมาในปีเดียวกันมีรายงานว่าโพลิมอร์ฟีซึมในยีน *IRF6* มีความสัมพันธ์แบบ linkage disequilibrium กับปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ จากที่กล่าวมาเห็นได้ว่าการศึกษาด้วยวิธีนี้นอกจากจะทำให้พบการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคแล้ว ยังได้ข้อมูลโพลิมอร์ฟีซึมอีกด้วย

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *MSX1* และ *PVRL1* มีความแตกต่างกัน โดยยีน *MSX1* มีรายงานการกลายพันธุ์เพียงอัลลีลเดียว ส่งผลต่อการเกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่ทั้งที่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการและไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ผลเช่นเดียวกันกับที่เคยมีรายงานมาก่อน ส่วนยีน *PVRL1* ต้องมีการกลายพันธุ์ทั้ง 2 อัลลีลจึงจะส่งผลต่อการเกิดโรค ในขณะที่การกลายพันธุ์เพียงอัลลีล

เดียวสนับสนุนให้คนที่มีอัลลีลดังกล่าวเสี่ยงต่อการเป็นโรคมากกว่าในคนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบ V396M เพียงอัลลีลเดียวในผู้ป่วย และไม่พบอัลลีลดังกล่าวในการตรวจหาในโครโมโซมปกติ 400 โครโมโซม หลักฐานนี้สนับสนุนว่าอัลลีล V396M อาจจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรค ซึ่งรูปแบบการกลายพันธุ์นี้แตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อน เมื่อพิจารณาการกลายพันธุ์ที่มีรายงานมาก่อนพบว่ามีเพียง 3 ตำแหน่ง ซึ่งทั้งสามตำแหน่งส่งผลให้โปรตีนมีขนาดสั้นลงจนไม่มีส่วน E/A-X-Y-V แต่การกลายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้เป็นแบบ missense mutation ซึ่งยังมีส่วนของ E/A-X-Y-V จึงเป็นไปได้ที่รูปแบบการกลายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนลำดับเบสในยีน *MSX1* ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง เป็นการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งและโพลิมอร์ฟิซึม 6 ตำแหน่ง เป็นการเปลี่ยนเบสเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานใน Jezewski P *et al.* (2003) 1 ตำแหน่ง (ตารางที่ 10) และ Suzuki Y *et al.* (2004) 4 ตำแหน่ง (ตารางที่ 10) และการเปลี่ยนของลำดับเบสใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน 3 ตำแหน่ง (ตารางที่ 10) โดยมี 2 ตำแหน่งของการเปลี่ยนเบสที่สรุปผลต่างกัน คือ A30A และ P147Q ซึ่งในการศึกษานี้สรุปทั้ง 2 ตำแหน่ง เป็นโพลิมอร์ฟิซึม แต่ในการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งสองตำแหน่งสรุปว่าเป็นการกลายพันธุ์

A30A เป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ในการศึกษานี้จึงไม่ได้ทำการตัดเอนไซม์ในคนปกติเพื่อตรวจหาการเปลี่ยนเบสดังกล่าว แต่อาจมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการ exon splicing โดยเป็นตำแหน่ง exon splicing enhancer (ESE) ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาในเรื่องนี้ เนื่องจากไม่มี RNA ของผู้ป่วย

อัลลีล P147Q ตรวจพบในคนปกติ โดยพบในความถี่ 6/120 โครโมโซม ซึ่งจัดได้ว่าเป็น common allele (มากกว่า 1%) แต่จากรายงานของ Suzuki Y *et al.* (2004) ในคนเวียดนามไม่พบอัลลีลดังกล่าวในคนปกติที่ไม่มีสมาชิกในครอบครัวเป็นโรคอย่างน้อย 500 คน สันนิษฐานว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสนี้อาจเป็นโพลิมอร์ฟิซึมแต่อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่เกิดโรคในคนเวียดนาม (linkage disquilibrium) ผู้ป่วยชาวเวียดนามจึงตรวจพบอัลลีลดังกล่าวอยู่ด้วย แต่ไม่พบในคนปกติ

อย่างไรก็ตามการศึกษาการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่ในครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์ต่อหน้าที่โดยตรง และในการกลายพันธุ์แบบ silent mutation ไม่ได้ทำการศึกษาเรื่อง exon splice enhancer (ESE) เนื่องจากไม่มี RNA ของผู้ป่วย จึงควรทำการศึกษาเรื่องดังกล่าวเพิ่มเติม

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ที่ผ่านมาของยีน *MSX1* สรุปได้ว่าการกลายพันธุ์บางตำแหน่งในยีนนี้ส่งผลให้เกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ ข้อมูลดังกล่าวนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาในครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่ม

อาการ เนื่องจากอัตราการเกิดซ้ำในครอบครัวที่มีผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์ในยีนนี้จะแตกต่างจากครอบครัวที่ไม่มีการกลายพันธุ์มาก เนื่องจากการกลายพันธุ์ในยีนนี้มีการถ่ายทอดแบบยีนเด่นบนออโตโซม และการศึกษาการทำงานของยีนนี้ต่อไปในอนาคตอาจทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดโรคได้มากขึ้น รวมทั้งอาจหาวิธีป้องกันการเกิดโรคได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย