การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันโดยใช้ไมโครอาร์เอ็นเอในกระแสเลือดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลังตาย

นายปรัชญ มีนาทุ่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Circulating microRNA as a post-
mortem biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction

Mr. Prachaya Menathung

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันโดยใช้ไมโครอาร์เอ็นเอในกระแสเลือดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลังตาย
โดย	นายปรัชญ มีนาทุ่ง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

Chulalongkorn University

ปรัชญ มีนาทุ่ง : การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันโดยใช้ไมโครอาร์เอ็นเอในกระแสเลือดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลังตาย (Circulating microRNA as a post-mortem biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ. กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน, 54 หน้า.

miRNA คือ อาร์เอ็นเอที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding RNA) มีขนาดราว 22 - 26 เบส มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในช่วงหลังการถอดรหัส (Post-Transcription) โดย miRNA จะทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มหรือลด (up/down-regulate) messenger RNA (mRNA) ภายในเซลล์ ในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ miRNA ถูกนำมาใช้ในการตรวจมะเร็ง เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ที่แตกต่างกันในกลุ่มควบคุม และกลุ่มผู้เสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจาการขาดเลือดเฉียบพลัน (AMI) ในตัวอย่างเลือดศพ พบว่า mir-133a mir-208b และ mir-499 ในกลุ่ม AMI มีการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 67% 78% และ 78% ค่าความไว (sensitivity) เท่ากับ 80% 80% และ 89% มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve; AUC) ของ receiver operating characteristic (ROC) อยู่ที่ 0.81 0.80 และ 0.83 ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้จึงได้แสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำ miRNA มาประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติเวชศาสตร์เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการวินิจฉัยเหตุเสียชีวิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ....

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

5674102530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION / POSTMORTEM / MIR-133A / MIR-208B / MIR-499

PRACHAYA MENATHUNG: Circulating microRNA as a post-mortem biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction. ADVISOR: ASST. PROF. KORNKIAT VONGPHAISARNSIN, M.D., 54 pp.

miRNAs, small noncoding RNA, are 22 - 26 nucleotides in length and regulate gene expression in post transcription. Their roles are to up/down-regulate mRNA in cell. In medical science, miRNA was generally studied in cancer diagnosis. The objective of this study is to observe a difference of mir-133a, mir-208b and mir-499 expressional level between control group and acute myocardial infarction (AMI) group in post-mortem blood. The result shows that the AMI group has significantly up/down regulation of mir-133a mir-208b and mir-499 in compared to control group. The sensitivity are 80% 80% and 89% and specificity are 67% 78% and 78%, respectively. The area under curve of receiver operating characteristic (ROC) are 0.81 0.80 and 0.83, respectively. Finally, the author has suggested that miRNAs is good for screening a cause of death for AMI.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Medical Science	Student's Signature	....
Academic Year:	2015	Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ร่วมทั้งความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ จนทำให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุลวงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค สำหรับข้อเสนอแนะในการนำเสนอ และการตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณภัทรกร แสงแก้วตระกูล และ คุณกวิน รัศมีไพศาล สำหรับความช่วยเหลือด้านการทดลอง ด้านเครื่องมือและเทคนิคต่างๆในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณอัจฉรา บุญเลิศ และ คุณปิยวรรณ แดงเก้า สำหรับความช่วยเหลือด้านการติดต่อสั่งซื้อชุดน้ำยาต่างๆ ในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณอธิภู อนันต์ดำรงรัตน์ คุณสุรศักดิ์ สุทัศน์ และ คุณดาวินี ชิณวงศ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณ บุคลากร และเจ้าหน้าที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ช่วยเหลือตลอดการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยให้การกำลังใจ และให้การสนับสนุนจนสามารถสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ช
สารบัญตาราง 1
สารบัญรูปภาพ 1
บทที่ 1 1
บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
แนวความคิดในการวิจัย (Experimental Design) 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
วิธีดำเนินการวิจัย 3
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย 3
บทที่ 2 4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Acute myocardial infarction, AMI) 4
การบาดเจ็บ และการตายของเซลล์ (Cell Injury and Death) 6
โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันกับการบาดเจ็บของเซลล์ 7
การวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันในศพทางนิติเวชศาสตร์ 11
การใช้เอนไซม์ในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

การใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิต 16
ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA) 17
การสังเคราะห์ miRNA 18
miRNA กับบทบาทที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) 19
miRNA กับการจำแนกชนิด 21
Circulating miRNAs 21
Tissue Specific miRNAs 21
microRNA133a (mir-133a) 22
microRNA208b (mir-208b) 24
microRNA499 (mir-499) 25
การใช้ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิต 26
บทที่ 3 27
วิธีดำเนินการวิจัย 27
การทดลองในมนุษย์ 27
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา 27
วิธีการวิจัย 27
1. เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง 27
2. การคัดเลือก miRNA 28
3. การเตรียมตัวอย่างเลือด 29
4. ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง 29
5. ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (Reverse Transcription) 30
6. การวัดปริมาณ cDNA (Real-time PCR) 31
7. การรวบรวมข้อมูล (Data collection) 32

หน้า

8. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) 32
9. การทดสอบสมมุติฐานการวิจัย 33
10. ข้อพิจารณาทางจริยธรรม (Ethical consideration) 34
11. ข้อจำกัดในการทำวิจัย (Limitation) 34
12. อุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to Solve the Problem) 35
อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้น 35
มาตรการในการแก้ไข 35
บทที่ 4 36
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 36
การทดลอง 36
การเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ในกลุ่มตัวอย่างกลุ่มวิจัย และกลุ่มควบคุม 36
การเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-133a 37
การเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-208b 38
การเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-499 39
การทดสอบด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC) 40
อัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR (%PCR Success Rate) 42
ความสัมพันธ์ระหว่าง อายุ เพศ สาเหตุการเสียชีวิต ช่วงเวลาเสียชีวิต 43
บทที่ 5 45
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 45
วิจารณ์ผลการทดลอง 45
ข้อเสนอแนะ 47
รายการอ้างอิง 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ตารางจาก Robbins Basic Pathology 9^{th} Edition).. 13

ตารางที่ 2 miRNA ที่แสดงออกในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน 20

ตารางที่ 3 ตารางคำนวณความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจ. Error! Bookmark not defined.

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ค่ามัธยฐาน (Median) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ของ mir-133a mir-208b และ mir-499 ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI 36

ตารางที่ 5 ตารางแสดงผลของการเปรียบเทียบค่า Ct ของ mir-133a โดยใช้สถิติ T-test 37

ตารางที่ 6 ตารางแสดงผลของการเปรียบเทียบค่า Ct ของ mir-208b โดยใช้สถิติ T-test............. 38

ตารางที่ 7 ตารางแสดงผลของการเปรียบเทียบค่า Ct ของ mir-208b โดยใช้สถิติ T-test............. 39

ตารางที่ 8 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR ของ U6b... 42

ตารางที่ 9 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR ของ mir-133a 42

ตารางที่ 10 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR ของ mir-208b....................................... 42

ตารางที่ 11 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR ของ mir-499 42

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของหลอดเลือดแดงโคโรนารี (http://galleryhip.com/coronary-arteries.html เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558) 4

รูปที่ 2 แสดงการสร้าง Collateral vessels หรือหลอดเลือดขนาดเล็กเพื่อเป็นทางผ่านให้เลือดสามารถไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ (http://circ.ahajournals.org/content/116/11/e340/F1.expansion เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558) 5

รูปที่ 3 แสดงระยะต่างๆของเซลล์ ในการตอบสนองต่อ Stress และ สิ่งเร้าที่รุนแรง (Injurious stimuli) (ภาพจาก Robins Basic Pathology 9th Edition) 7

รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เซลล์ ปกติ เซลล์ adapted, Reversible injury และ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ตายแล้ว (ภาพจาก Robins Basic Pathology 9th Edition) 8

รูปที่ 5 แสดงภาพตัดขวางของหัวใจห้องล่างซ้ายที่มีการขยายขนาดของเซลล์ (Hypertrophy) รูปขวาคือกล้ามเนื้อหัวใจที่ไม่มีการขยายขนาด เปรียบเทียบกับหัวใจปกติ (ตรงกลาง) หัวใจที่มีความดันสูงเกินไป(รูปซ้าย) จะมีการเพิ่มขนาดของมวล ผนังหนาขึ้น และช่องภายใน (lumen) ขนาดเล็ก ส่วนหัวใจที่มีปริมาตรสูงเกินไป (รูปขวา) จะมีการเพิ่มมวล แต่ช่องภายใน (lumen) จะกว้าง และมีขนาดใหญ่ ผนังเป็นปกติ (ภาพจาก Robins Basic Pathology 9th Edition) 9

รูปที่ 6 แสดงกล้ามเนื้อหัวใจที่กำลังเข้าสู่การตายของเซลล์ แบบ Necrosis หลังจากหลอดเลือดแดงโคโรนารี(coronary artery) อุดตัน การตายของเซลล์แบบ Necrosis เริ่มจากตรงกลาง และขยายไปราวหนึ่งในสามจะขาดเลือดไปเลี้ยง (Subendocardial infarction) โดยผนังของหัวใจจะหนาขึ้น แล้วเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ (ภาพจาก Robbins Basic Pathology 9th Edition)............... 10

รูปที่ 7 แสดงถึงการพึ่งพาหลอดเลือดข้างเคียงหลังจากเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด การสังเกตด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บ บริเวณที่เกิดจากตารางที่ 1 เรียงตามลำดับช่วงเวลาที่เซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจได้รับความเสียหาย (ภาพจาก Robbins Basic Pathology 9th Edition).. 11

รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของเซลล์ปกติ การตายของเซลล์ และการบาดเจ็บของเซลล์ตามระยะเวลาที่ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งในระดับชีวเคมี และโครงสร้างภายในเซลล์โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กล้องจุลทรรศน์ และ ระดับที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (ภาพจาก Robbins Basic Pathology 9th Edition) 15

รูปที่ 9 ไมโครอาร์เอ็นเอจาก (ภาพจาก http://cegg.unige.ch/mirortho/results?seed=mir-208 เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558) 17

รูปที่ 10 รูปแบบจำลองการสังเคราะห์และการทำงานของ miRNA ภายในเซลล์ (ภาพจาก http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnins.2012.00013/full เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558) 19

รูปที่ 11 แสดงหน้าต่างของเว็บไซด์ที่ใช้ระบุข้อมูล Sequence ของ miRNA ที่ใช้ในการศึกษา (ภาพจาก https://www.lifetechnologies.com/th/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 เมษายน 2558) 28

รูปที่ 12 แผนภาพแสดงค่า Ct (cycle threshold) ของ mir-133a ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI โดยใช้สถิติ T-test 37

รูปที่ 13 แผนภาพแสดงค่า Ct (cycle threshold) ของ mir-208b ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI โดยใช้สถิติ T-test 38

รูปที่ 14 แผนภาพแสดงค่า Ct (cycle threshold) ของ mir-499 ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI โดยใช้สถิติ T-test 39

รูปที่ 15 รูปภาพแสดง Receiver Operating Characteristic (ROC) ของ mir-133a 40

รูปที่ 16 รูปภาพแสดง Receiver Operating Characteristic (ROC) ของ mir-208b 41

รูปที่ 17 รูปภาพแสดง Receiver Operating Characteristic (ROC) ของ mir-499 41

Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

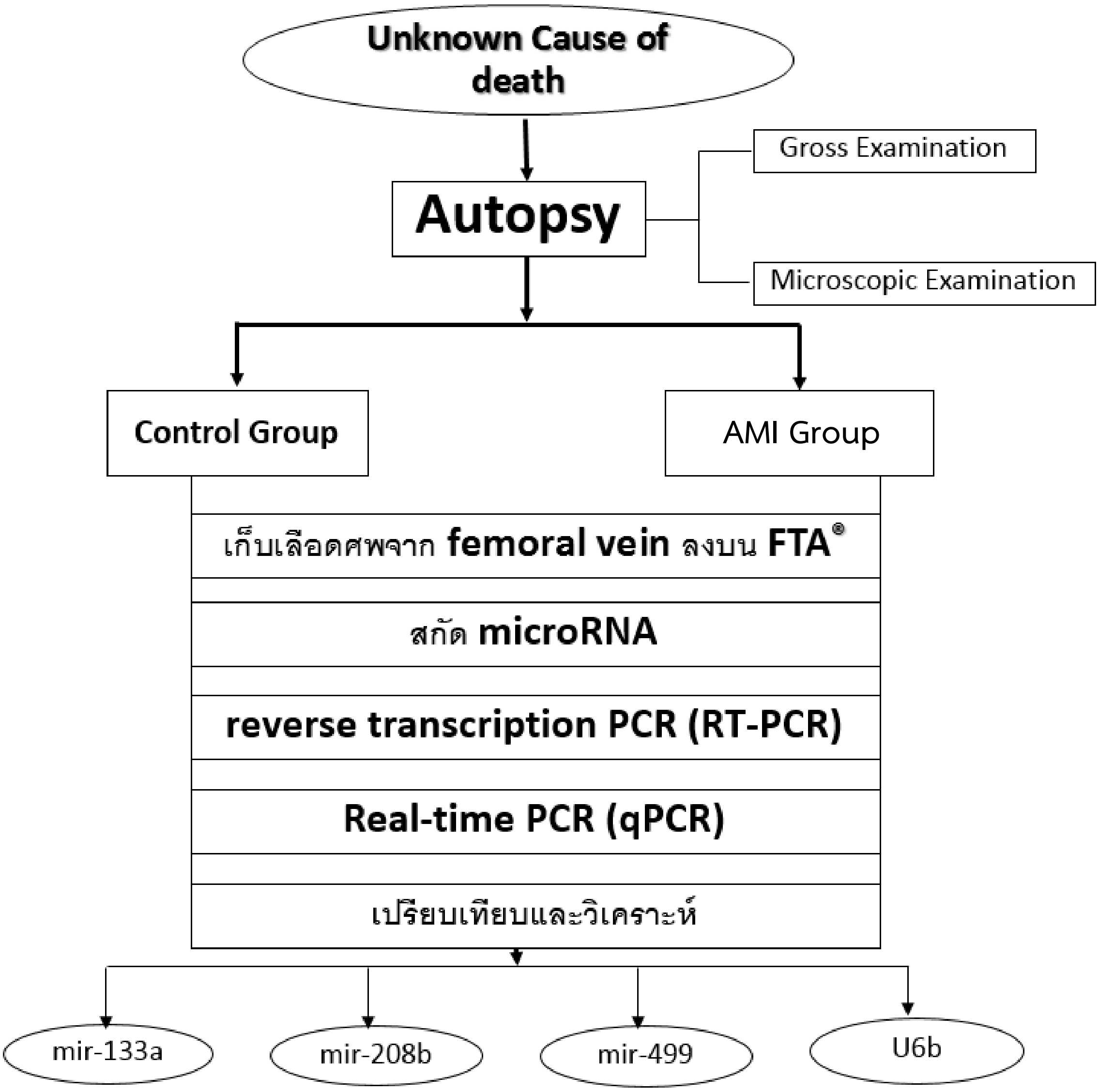
โรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดเฉียบพลัน หรือ กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Acute Myocardial Infarction, AMI) เป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก ปีพ.ศ. 2553 สมาคมโรคหัวใจแห่งสหรัฐอเมริกา (American Heart Association) ได้รายงานสถิติของผู้เสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันมีจำนวนมากถึง 7.2 ล้านคนหรือคิดเป็น 12.2 % ของสาเหตุการเสียชีวิตทั้งหมดทั่วโลก (1) ส่วนในประเทศไทย สำนักโรคไม่ติดต่อ กระทรวงสาธารณสุขรายงานระหว่างปี พ.ศ. 2550 - 2556 พบผู้ป่วยด้วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน 1,726,346 รายจากจำนวนผู้ป่วยโรคหัวใจทั้งหมด โดยเป็นผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร 231,960 ราย และพบมีอัตราการเสียชีวิตในปี พ.ศ. 2556 สูงถึง 17,388 ราย เฉลี่ยชั่วโมงละ 2 ราย ดังนั้น โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันจึงเป็น 1 ใน 3 ของสาเหตุการเสียชีวิตสูงสุดซึ่งใกล้เคียงกับการเสียชีวิตด้วยอุบัติเหตุ และโรคมะเร็ง (2) การตรวจวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดทางนิติเวชศาสตร์นั้นก็มีข้อจำกัดในเรื่องเวลา ทั้งการวินิจฉัย และการออกผล เนื่องจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์นั้น ขึ้นกับเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจ และระยะเวลาของการเกิดการบากเจ็บของกล้ามเนื้อหัวใจ หากจะสังเกตการอุดกั้นรุนแรงของหลอดเลือดหัวใจ จนทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตายได้นั้น การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ในระยะแรกๆ อาจจะพบเพียงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจบวมเพียงเท่านั้น และไม่สามารถสังเกตด้วยตาเปล่าได้หากเกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจในช่วงเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง (3) ดังนั้นการศึกษาโดยการนำไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ในเลือดซึ่งเคยมีการทดลองในการตรวจผู้ป่วยทางคลินิกมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางนิติเวชศาสตร์น่าจะให้ผลที่รวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำที่สูงกว่า อีกทั้ง miRNA เคยถูกนำไปใช้ในการจำแนกชนิดของสารคัดหลั่งที่พบในที่เกิดเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพมาแล้ว นั้นก็เพราะ miRNA มีขนาดเล็ก และมีความทนทานต่อการเสื่อมสภาพ miRNA จึงเป็นทางเลือกที่ดีที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางนิติเวชศาสตร์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของ mir-133a mir-208b และ mir-499 โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้เสียชีวิตด้วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (AMI) กับผู้ที่เสียชีวิตด้วยเหตุอื่นในตัวอย่างเลือดจากผู้เสียชีวิตทางนิติเวชศาสตร์

เพื่อทดสอบประสิทธิผล (Effectiveness) ในการใช้ mir-133a mir-208b และ mir-499 เป็นตัวบ่งชี้เหตุเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (AMI)

แนวความคิดในการวิจัย (Experimental Design)



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้สามารถนำ miRNA ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจเฉียบพลันในศพทางนิติเวชศาสตร์ได้
2. สามารถนำการศึกษานี้ไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคอื่นได้ หรือ ทดลองกับ miRNA ชนิดใหม่ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

Analytical Study

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ที่	ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	ระยะเวลา : 12 เดือน											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	เลือกหัวข้อการวิจัย												
2.	ปรึกษาอาจารย์ที่ปรึกษา												
3.	รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง												
4.	เขียนโครงร่างวิทยานิพนธ์												
5.	ทำการทดลอง												
6.	รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล												
8.	จัดทำรายงานการวิจัย												
9.	รายงายวิจัยฉบับสมบูรณ์												

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

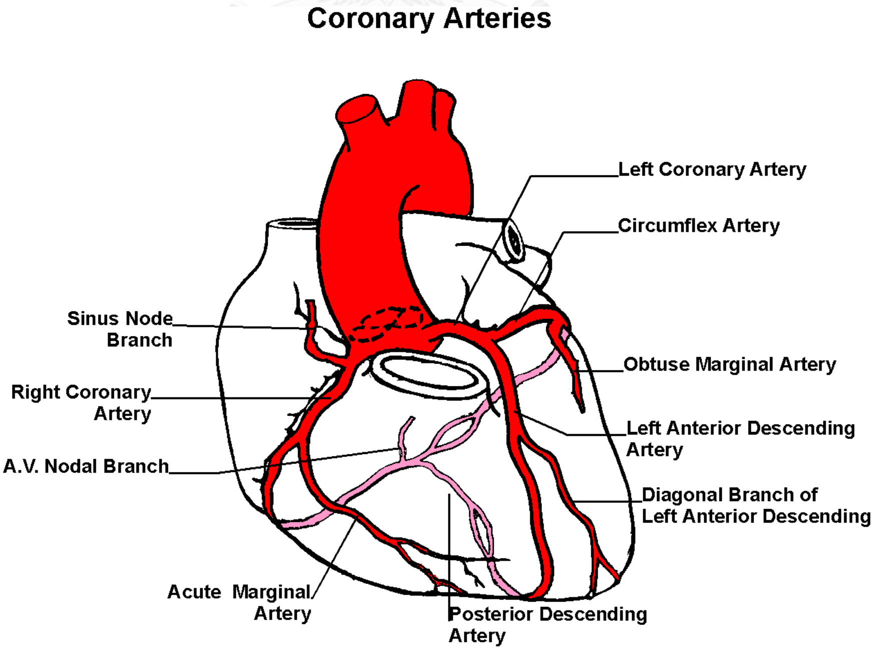
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Acute myocardial infarction, AMI)

โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน เป็นภาวะที่เลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจไม่เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งเกิดจากหลอดเลือดแดงโคโรนารีที่เลี้ยงหัวใจ (Coronary arteries) มีการอุดตัน สาเหตุหลักคือความผิดปกติของหลอดเลือดแดงที่เรียกว่า Atherosclerosis หรือภาวะหลอดเลือดแดงตีบแข็งเป็นผลให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และตาย (Myocardial necrosis) โดยการเกิด Atherosclerosis นั้นมักเกิดกับ Epicardial coronary arteries ซึ่งประกอบด้วยหลอดเลือดหลัก 3 เส้นดังนี้ (รูปที่ 1) (4, 5)

1. Left anterior descending (LAD)
2. Left circumflex (LCX)
3. Right coronary artery (RCA)

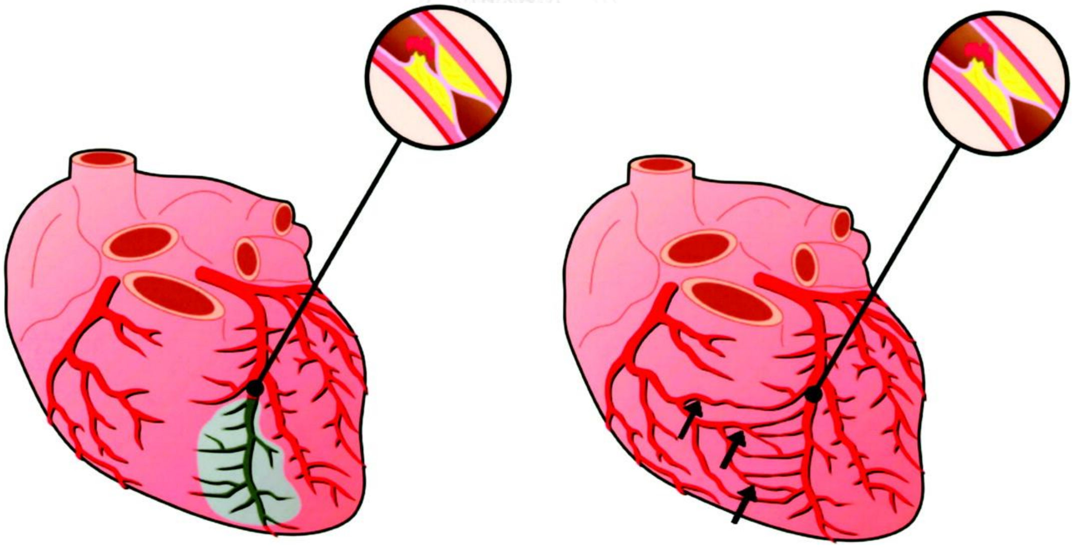


รูปที่ 1 *แสดงลักษณะทางกายวิภาคของหลอดเลือดแดงโคโรนารี (http://galleryhip.com/coronary-arteries.html เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558)*

การเกิด Atherosclerosis อาจเกิดขึ้นกับหลอดเลือดใดหลอดเลือดหนึ่งหรือเกิดกับหลอดเลือดแดงทั้ง 3 เส้นเลยก็ได้ โดยการเกิด Atherosclerosis มีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก 2 แบบหลัก คือ

Chronic Atherosclerosis คือการเกิด Atherosclerosis ที่แบบค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงขึ้นหลอดเลือดอุดตันในร้อยละ 75 จนทำให้กล้ามเนื้อหัวใจรับเลือดไม่เพียงพอต่อความต้องการ ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการเจ็บหน้าอก แน่นหน้าอก เมื่อหัวใจทำงานหนัก หรือมีการทำกิจกรรมที่มากกว่าปกติ เรียกอาการนี้ว่า Stable Angina และเมื่อมีการพัฒนาจนหลอดเลือดอุดตันเกินร้อยละ 90 แล้ว จะก่อให้เกิดการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจแบบเรื้อรังส่งผลให้มีอาการแน่นหน้าอกแม้อยู่ในขณะพัก เรียกว่า Unstable Angina และอาจเข้าสู่ภาวะหัวใจล้มเหลวได้ในที่สุด

จากอาการที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นการเกิด Atherosclerosis แบบ Chronic atherosclerosis นั้นจะเกิดแบบค่อยเป็นค่อยไปร่างกายจึงมีการสร้างหลอดเลือดขนาดเล็กเพื่อเป็นทางผ่านให้เลือดสามารถไหลผ่านไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจเพื่อป้องกันความเสียหายจากการขาดเลือด เรียกว่า Collateral vessels ดังนั้นเมื่อเกิดอาการการอุดตันของหลอดเลือดอย่างสมบูรณ์ ก็มักจะไม่พบการตายของกล้ามเนื้อหัวใจเป็นบริเวณกว้างได้



รูปที่ 2 *แสดงการสร้าง Collateral vessels หรือหลอดเลือดขนาดเล็กเพื่อเป็นทางผ่านให้เลือดสามารถไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ (http://circ.ahajournals.org/content/116/11/e340/F1.expansion เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558)*

Acute plague change คือการอุดตันของหลอดเลือดแดงแบบกะทันหันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ Atherosclerotic plaque ทำให้เกิดก้อนลิ่มเลือด (Thrombus) ไปอุดหลอดเลือด หากเลือดไม่สามารถผ่านไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจในระยะเวลานาน จะส่งผลให้เกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจเฉียบพลันได้

เมื่อมีการอุดตันของหลอดเลือดแดงโคโรนารี(Coronary Artery Occlusion) ทำให้ขาดเลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจส่งผลกระทบทันทีต่อหน้าที่ และโครงสร้างของเซลล์ ภายในไม่กี่วินาทีหลังการอุดตัน Aerobic Glycolysis จะหยุดลงนำไปสู่การลดลงของ Adenosine Triphosphate (ATP) และอาจเกิดการสะสมของ Noxious Metabolites (เช่น Lactic acid) ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ผลที่ตามมาจะทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจไม่สามารถหดตัวได้ตามปกติ จะเกิดขึ้นภายในเวลาไม่เกิน 1 นาทีหลังจากขาดเลือด การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจกลับสู่ภาวะปกติ (Reversible injury) ได้ถ้าการอุดตันกินเวลาไม่นาน ประมาณ 20-30 นาที แต่หากการขาดเลือดดำเนินต่อไป โครงสร้างและ organelles ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะถูกทำลาย เช่น Disruption of cell membrane และ มีการปล่อย Lysosomal enzymes ออกมาย่อยเซลล์ ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตาย (necrosis) ในที่สุด คือเป็นการทำลายกล้ามเนื้อหัวใจถาวร โดยทั่วไปมักเกิดเมื่อมีการขาดเลือดยาวนานประมาณ 30 นาที และถึงแม้ว่าหลัง 30 นาทีจะเริ่มมีการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเกิดขึ้นซึ่งจะถือว่าเป็นการบาดเจ็บถาวร (Irreversible injury) แล้ว แต่กล้ามเนื้อบริเวณดังกล่าวไม่ได้ตายพร้อมกันทั้งหมด ดังนั้นหากมีเลือดไหลผ่านจุดอุดตันไปได้ก็อาจจะช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจบางส่วนในรอดตายได้ ระยะเวลามักจะอยู่ในช่วง 2-4 ชั่วโมง หรือไม่เกิน 6 ชั่วโมง

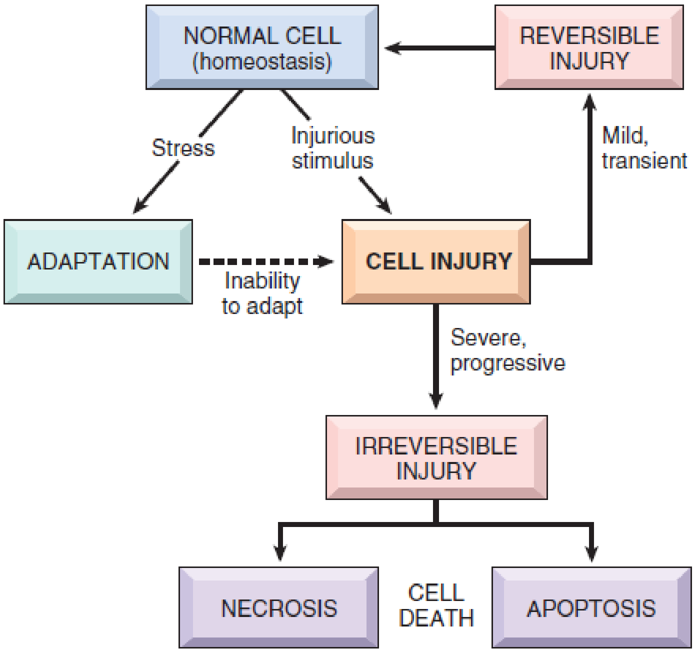
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การบาดเจ็บ และการตายของเซลล์ (Cell Injury and Death)

การตอบตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะเครียด (Stress) และสารพิษในธรรมชาติ เซลล์จะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง และหน้าที่ โดยเซลล์จะพยายามรักษาสมดุลเซลล์ที่เรียกว่า Homeostasis ให้อยู่ในสภาวะปกติ หากเซลล์ได้รับสิ่งเร้าที่ไม่ก่อโรคหรือพยาธิสภาพ (Physiologic stimuli) หรือ สิ่งเร้าที่ก่อโรคหรือที่เกิดจากการเป็นโรค (Pathologic stimuli) จึงมีการการปรับตัวเพื่ออยู่รอด (Viability) และ รักษาหน้าที่ (Function) ของเซลล์เอาไว้ เช่น การเพิ่มขนาดของเส้นใยเซลล์เมื่อสัมผัสสิ่งเร้า (Hypertrophy) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Hyperplasia) การฝ่อของกล้ามเนื้อจากการสูญเสียโปรตีนภายในเซลล์ (Atrophy) และการตอบสนองต่อสิ่งเร้าโดยเปลี่ยนจากเซลล์ชนิดหนึ่งไปเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่อีกชนิดหนึ่ง (Metaplasia) (3, 5)

การบาดเจ็บของเซลล์ (Cell injury) (รูปที่ 3) จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับอันตรายจากภายนอก หากสภาวะดังกล่าวไม่รุนแรง เซลล์ที่บาดเจ็บอาจสามารถกลับมาฟื้นตัวเพื่อเข้าสู่สภาพการทำงาน

ปกติได้ (Reversible injury) แต่หากได้รับ Stress ที่รุนแรงก็จะส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บถาวร (Irreversible injury) และนำไปสู่การตายของเซลล์ โดยการตายของเซลล์นั้นเป็นหนึ่งในกิจกรรมที่สำคัญของเซลล์ในโรคที่มีการพัฒนาในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ การตายของเซลล์นั้นเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การขาดเลือด(Ischemia) การติดเชื้อ (Infection) สารพิษ (Toxin) และปฏิกิริยาที่เกิดจากภูมิคุ้มกัน (Immune response) นอกจากนี้การตายของเซลล์ยังเป็นกระบวนการปกติที่มีความจำเป็นใน การเจริญของตัวอ่อน (Embryogenesis) การพัฒนาของอวัยวะ และการรักษา ภาวะความสมดุล (Homeostasis)

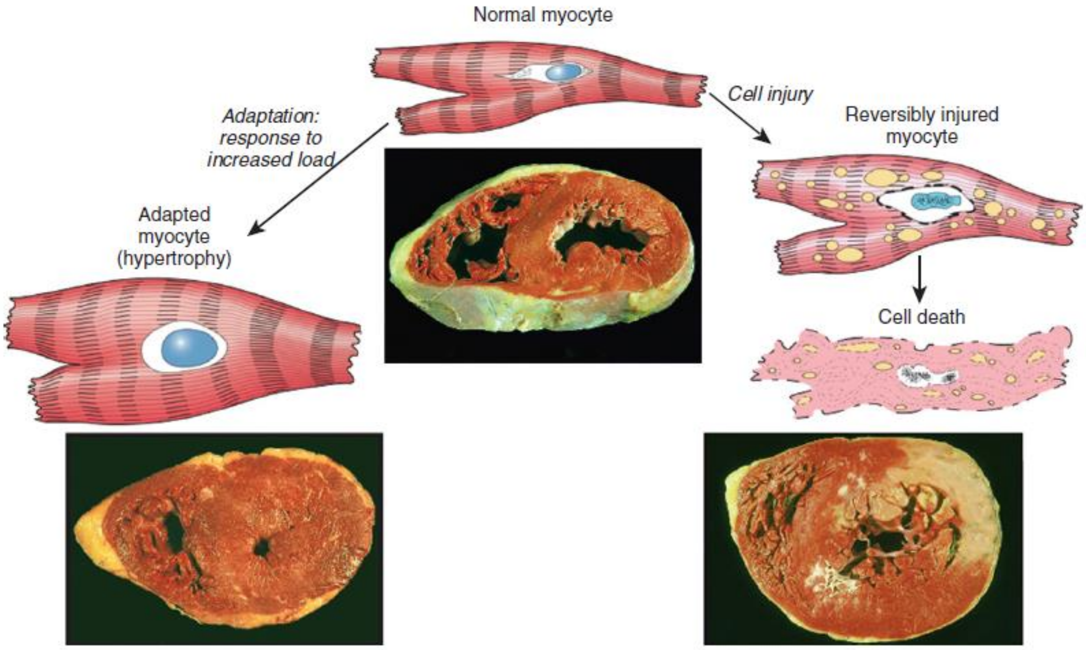


รูปที่ 3 *แสดงระยะต่างๆของเซลล์ ในการตอบสนองต่อ Stress และ สิ่งเร้าที่รุนแรง (Injurious stimuli) (ภาพจาก Robins Basic Pathology 9th Edition)*

โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันกับการบาดเจ็บของเซลล์

ปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อหัวใจ (Myocardium) เช่น ความดันโลหิตสูง(Hypertension) หรือ ลิ้นหัวใจตีบ (Stenotic valve) ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะเกิดจากการปรับตัวโดยการขยายขนาดเซลล์ (Hypertrophy) จนเกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary artery) ทำให้เลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือด (Ischemia) เป็นเวลานานอาจทำให้กล้ามเนื้อหัวใจได้รับความเสียหายได้ ในบางครั้งเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอาจกลับคืนสภาพได้ (Reversibly injury) ถ้าได้รับความเครียด (Stress) น้อย หรือการอุดตันของหลอด

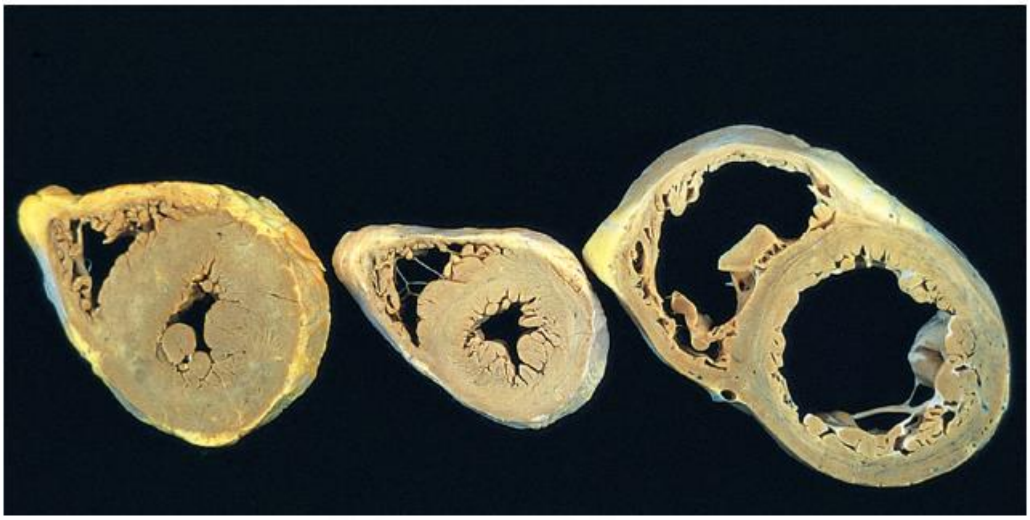
เลือดโคโรนารีเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ส่วนการบาดเจ็บแบบถาวร (Irreversible injury) และการตายของเซลล์ (Infarction) จะเกิดขึ้นเมื่อหลอดเลือดแดงโคโรนารีอุดตันอย่างสมบูรณ์ หรืออุดตันมาเป็นเวลานาน นอกจากนี้ความเครียดที่เซลล์ได้รับไม่ได้ส่งผลเพียงการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ (Morphology) แต่ยังส่งผลต่อการทำงานหน้าที่ และลักษณะเนื้อเยื่ออีกด้วย ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Myocytes) ที่เป็นได้รับบาดเจ็บเล็กน้อยคืนสภาพได้ และอาจมีลักษณะคล้ายกับรูปร่างของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจปกติ ดังนั้นความเครียดจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปรับตัวของเซลล์ หรือ เป็นเหตุให้เกิด Reversible injury หรือ Irreversible injury ในเซลล์เช่นกัน (3)



รูปที่ 4 *แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เซลล์ ปกติ เซลล์ adapted, Reversible injury และ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ตายแล้ว (ภาพจาก Robins Basic Pathology 9th Edition)*

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์หลังได้รับบาดเจ็บ แบ่งได้เป็น 2 ระดับ คือ การบาดเจ็บที่สามารถคืนสภาพได้ (Reversible cell injury) และ การบาดเจ็บที่ไม่สามารถคืนสภาพได้ (Irreversible cell injury) จนเซลล์ตาย (Cell death) โดย Reversible cell injury เป็นการบาดเจ็บของเซลล์แบบไม่รุนแรงมากนัก หรือ เป็นช่วงระยะแรก ๆ หลังได้รับบาดเจ็บ โดยการบาดเจ็บนั้นทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปบางส่วน แต่เซลล์ก็ยังสามารถคืนสภาพดังเดิมได้ภายหลังเมื่อสิ่งเร้านั้นหมดไป กลไกหลัก ๆ คือ การลดปริมาณลงของ Oxidative phosphorylation ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ขาดพลังงาน ATP ส่งผลให้มีน้ำทะลักเข้าสู่เซลล์ และมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์บวมน้ำ (Cellular swelling) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทาง

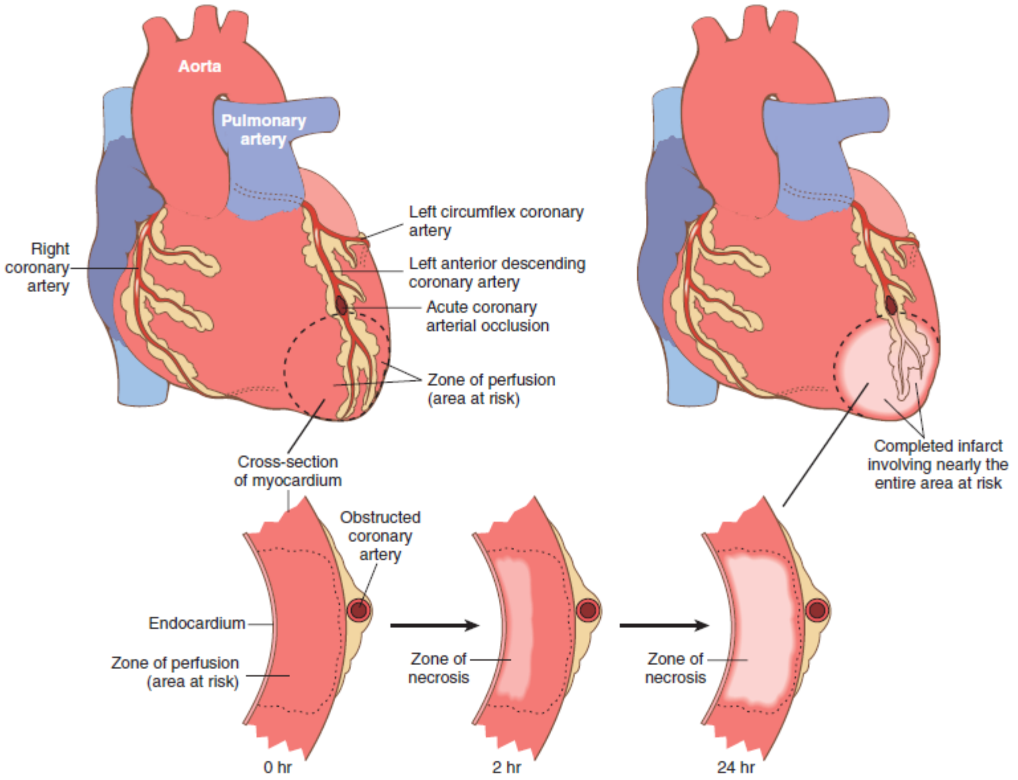
โครงสร้างเบื้องต้น และถ้าการบาดเจ็บนั้นรุนแรงเกินกว่าที่จะซ่อมแซม หรือ เกิน Point of no return แล้วเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นและเข้าสู่ระดับ Irreversible injury จนเซลล์ตาย จากตัวอย่างในรูปที่ 4 แสดงถึงการปรับเปลี่ยนรูปร่างของกล้ามเนื้อหัวใจแบบขยายขนาด (Hypertrophy) ในรูปล่างซ้าย ทำให้ผนังของหัวใจห้องล่างซ้ายหนาขึ้นราว 2 เซนติเมตร (ปกติ 1 - 1.5 เซนติเมตร) ส่วนรูปถัดมา (ขวากลาง) เป็นการบาดเจ็บแบบ Reversible injury โดยเซลล์จะบวมน้ำ และรูปล่างขวาแสดงให้เห็นเซลล์ตายแบบ necrosis สังเกตได้จากสีที่จางลงซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ภาพทั้งสามตัวอย่างนั้นถูกย้อมด้วยสี Triphenyltetrazolium Chloride โดยสีของกล้ามเนื้อหัวใจที่เป็นปกติจะติดสีแดงอมม่วง (Magenta) หากติดสีจางหรือย้อมไม่ติดแสดงว่าเซลล์ตายซึ่งเกิดการสูญเสียเอนไซม์หลังจากที่เซลล์ตาย



รูปที่ 5 *แสดงภาพตัดขวางของหัวใจห้องล่างซ้ายที่มีการขยายขนาดของเซลล์ (Hypertrophy) รูปขวาคือกล้ามเนื้อหัวใจที่ไม่มีการขยายขนาด เปรียบเทียบกับหัวใจปกติ (ตรงกลาง) หัวใจที่มีความดันสูงเกินไป(รูปซ้าย) จะมีการเพิ่มขนาดของมวล ผนังหนาขึ้น และช่องภายใน (lumen) ขนาดเล็ก ส่วนหัวใจที่มีปริมาตรสูงเกินไป (รูปขวา) จะมีการเพิ่มมวล แต่ช่องภายใน (lumen) จะกว้าง และมีขนาดใหญ่ ผนังเป็นปกติ (ภาพจาก Robins Basic Pathology 9th Edition)*

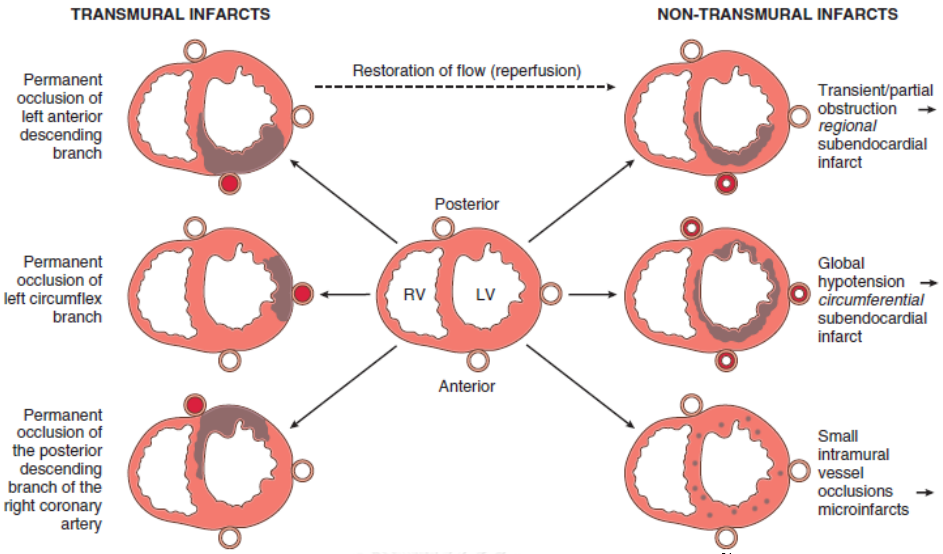
กล้ามเนื้อหัวใจเมื่อได้รับสิ่งเร้าก่อให้เกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างรวมทั้งขนาดมวลของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Myocyte) ที่เพิ่มขึ้น แม้จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ แต่ยังคงสามารถปรับตัวเพื่อเพิ่มการทำหน้าที่ได้ โดยเพิ่มจำนวนซาร์โคเมียร์ (Sarcomere) (รูปที่ 5) ในสภาวะที่ความดันสูงเกินไป (เช่น ความดันโลหิตสูง หรือลิ้นหัวใจตีบ) Sarcomere สายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีขนาดเท่าเดิม และการขยายขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นผลทำให้ผนังของหัวใจห้องล่างหนาขึ้นแต่ขนาดของห้อง (Chamber) ไม่ได้ใหญ่ขึ้นตาม ส่วนสภาวะที่หัวใจมีปริมาตรเกินกำหนด (เช่น ลิ้นหัวใจรั่ว)

Sarcomere สายใหม่จะถูกเติมลงใน Sarcomere สายเดิมเพื่อเพิ่มความยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ



รูปที่ 6 *แสดงกล้ามเนื้อหัวใจที่กำลังเข้าสู่การตายของเซลล์ แบบ Necrosis หลังจากหลอดเลือดแดงโคโรนารี(coronary artery) อุดตัน การตายของเซลล์แบบ Necrosis เริ่มจากตรงกลาง และขยายไปราวหนึ่งในสามจะขาดเลือดไปเลี้ยง (Subendocardial infarction) โดยผนังของหัวใจจะหนาขึ้นแล้วเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ (ภาพจาก Robbins Basic Pathology 9th Edition)*

การขาดเลือดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจนก่อให้เกิดการบาดเจ็บแบบไม่สามารถคืนสภาพได้ (Irreversible injury) มักเกิดบริเวณ Subendocardial zone เป็นบริเวณแรกๆ (รูปที่ 7) ที่เป็นเช่นนั้นก็เพราะว่าเป็นบริเวณสุดท้ายที่จะได้รับเลือดจาก Epicardial vessels และยังเป็นบริเวณที่ได้รับแรงดันสูงที่สุดอีกด้วยซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นอุปสรรคต่อการเข้าถึงของเลือด การขาดเลือดเป็นเวลานานทำให้การตายของเซลล์บริเวณนั้นขยายวงออก แล้วจะขยายเต็มที่โดยใช้เวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง หากไม่ได้รับการรักษาผนังของหลอดเลือดจะหนาขึ้นจากภายใน (Transmural infarct) หลังเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด การเกิด Infarction แบบต่างๆนั้นทั้งบริเวณ ขนาด รูปร่าง (Morphologic features) ของรอยโรคขึ้นอยู่กับหลายๆปัจจัย เช่น ขนาด และการกระจายของหลอดเลือดที่เข้ามาเลี้ยง (รูปที่ 8) อัตราการพัฒนา และระยะเวลาการอุดตันทำให้ลดเมทาบอลิซึม (Metabolism) ของกล้ามเนื้อหัวใจ



รูปที่ 7 *แสดงถึงการพึ่งพาหลอดเลือดข้างเคียงหลังจากเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด การสังเกตด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บ บริเวณที่เกิดจากตารางที่ 1 เรียงตามลำดับช่วงเวลาที่เซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจได้รับความเสียหาย (ภาพจาก Robbins Basic Pathology 9th Edition)*

การวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันในศพทางนิติเวชศาสตร์

การตรวจวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตในทางนิติเวชศาสตร์นั้นสามารถแบ่งได้เป็นสองวิธีดังนี้ คือ วิธีการผ่าศพตรวจดูด้วยตาเปล่า (Gross Examination) และ การตัดชิ้นเนื้อไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic Examination) การวินิจฉัยว่าเหตุที่ทำให้เสียชีวิตนั้นคือโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดหรือไม่นั้นจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหัวใจหลังจากขาดเลือด โดยปกติจะเห็นได้ด้วยตาเปล่าหลังจาก 12 ชั่วโมงขึ้นไปแล้ว จะพบเป็นบริเวณที่กล้ามเนื้อตายเป็นจุดคล้ำๆ และการสังเกตมักจะสังเกตที่หัวใจห้อง Left Ventricle เนื่องมาจากเป็นบริเวณที่มีหลอดเลือดที่เป็นสาเหตุของโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดมาเลี้ยงนั้นก็คือ (3, 5)

Left anterior descending coronary artery พบว่าเป็นหลอดเลือดที่พบการอุดตันบ่อยที่สุด (40-50%) ซึ่งหลอดเลือดดังกล่าวส่งเลือดไปเลี้ยง บริเวณ Apex และ Anteroinferior wall ของ Left ventricle และ Anterior portion of interventricular septum

Right coronary artery หลอดเลือดนี้จะส่งเลือดไปเลี้ยงบริเวณ Posterior wall of left ventricle, Posterior portion of interventricular septum, Right ventricular free wall พบประมาณ 30-40%

Left circumflex coronary artery หลอดเลือดนี้จะส่งเลือดไปเลี้ยงบริเวณ Lateral wall of left ventricle ยกเว้นส่วน Apex พบประมาณ 15-20%

ในระยะแรกเมื่อเซลล์เกิดการบาดเจ็บ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะเป็นระดับโมเลกุล หรือระดับชีวเคมีภายในเซลล์ก่อนโดยจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างให้เห็นด้วยตาเปล่าหรือโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ต่อมาโครงสร้างภายในเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สามารถสังเกตได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนซึ่งอาจจะใช้เวลาเป็นนาทีหรือชั่วโมง หลายชั่วโมงต่อมาจึงสามารถสังเกตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และการศึกษาด้วยตาเปล่า

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการขาดเลือดที่สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์ เริ่มเห็นได้ที่ 6-12 ชั่วโมงหลังการเกิดการขาดเลือด พบลักษณะเป็น Wavy fibers ที่เกิดจากแรงดึงจากกล้ามเนื้อปกติที่อยู่รอบๆ ซึ่งหลังจาก 12 ชั่วโมง จะสามารถเห็นการตายแบบ Coagulative Necrosis โดยจะพบ Pyknosis of nuclei และ Eosinophillic Cytoplasm นอกจากนี้ยังพบ มี Interstitial edema, Vascular congestion และ Hemorrhage ทำให้สามารถเห็นจุดคล้ำๆได้ด้วยตาเปล่า และจะมีเซลล์อักเสบเข้ามา ใน 12-24 ชั่วโมง ปริมาณของ Neutrophil ซึ่งเพิ่มขึ้นจนสามารถเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 3 เมื่อดูด้วยตาเปล่ากล้ามเนื้อจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีกล้ามเนื้อตาย จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นการสังเกตด้วยตาเปล่า และการตัดเอาชิ้นเนื้อไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันจะสามารถจะไม่สามารถระบุเหตุตายได้ชัดเจนหากผู้เสียชีวิตเสียชีวิตในช่วงเวลาก่อน 12 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 1 แสดงการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ตารางจาก Robbins Basic Pathology 9^{th} Edition) (3)

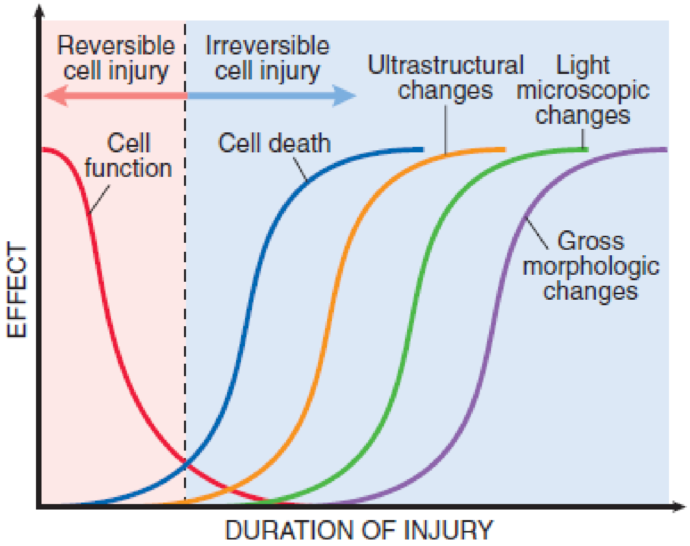
Time Frame	Gross Features	Light Microscopic Findings	Electron Microscopic Findings
Reversible Injury			
0-1½ hours	None	None	Relaxation of myofibrils; glycogen loss; mitochondrial swelling
Irreversible Injury			
½-4 hours	None	Usually none; variable waviness of fibers at border	Sarcolemmal disruption; mitochondrial amorphous densities
4-12 hours	Occasionally dark mottling	Beginning coagulation necrosis; edema; hemorrhage	
12-24 hours	Dark mottling	Ongoing coagulation necrosis; pyknosis of nuclei;hypereosinophilic appearance of myocytes; marginalcontraction band necrosis; beginning neutrophilic infiltrate	
1-3 days	Mottling with yellow-tan infarct center	Coagulation necrosis with loss of nuclei and striations; interstitial infiltrate of neutrophils	

3-7 days	Hyperemic border; central yellow-tan softening	Beginning disintegration of dead myofibers, with dying neutrophils; early phagocytosis of dead cells by macrophages at infarct border	
7-10 days	Maximally yellow-tan and soft, with depressed red-tan margins	Well-developed phagocytosis of dead Cells; early formation of fibrovascular granulation tissue at margins	
10-14 days	Red-gray depressed infarct borders	Well-established granulation tissue with new blood vessels and collagen deposition	
2-8 weeks	Gray-white scar, progressive from border toward core of infarct	Increased collagen deposition, with decreased Cllularity	
>2 months	Scarring complete	Dense collagenous scar	

จะเห็นได้ว่า การสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับการบาดเจ็บของเซลล์หรือการตายนั้นขึ้นกับเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจ และ ระยะเวลาของการบาดเจ็บ ดังนั้นการสังเกตผู้ป่วยหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary artery) อุดกั้นรุนแรงจนทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตายนั้น ถ้าหากการตรวจกล้ามเนื้อหัวใจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ในระยะแรกๆ อาจจะพบเพียงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจบวม

เท่านั้น และไม่สามารถสังเกตด้วยตาเปล่า หากเกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจไม่เกิน 12 ชั่วโมง (รูปที่ 8)

จากการตรวจเลือดในผู้ป่วยเพื่อหาระดับของเอนไซม์กล้ามเนื้อหัวใจ mRNA และ miRNA สามารถบ่งชี้ถึงการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้โดยไม่จำเป็นต้องรอถึง 12 ชั่วโมง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ mRNA และ miRNA ในระดับเซลล์ สามารถสังเกตได้แม้เกิดการตายเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการนำการตรวจหาระดับของ mRNA และ miRNA มาประยุกต์ใช้อาจเป็นทางเลือกที่ดีในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตด้วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน



รูปที่ 8 *แสดงความสัมพันธ์ของเซลล์ปกติ การตายของเซลล์ และการบาดเจ็บของเซลล์ตามระยะเวลาที่ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งในระดับชีวเคมี และโครงสร้างภายในเซลล์โดยการสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กล้องจุลทรรศน์ และ ระดับที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (ภาพจาก Robbins Basic Pathology 9th Edition)*

จากการศึกษาก่อนหน้า การตรวจวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันในผู้ป่วยพบว่าการตรวจเลือดเพื่อหาระดับของเอนไซม์ (Troponin-T, Troponin-I, CK-MB) เป็นวิธีการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล แต่การตรวจชันสูตรพลิกศพหรือการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตนั้นต่างออกไป เนื่องจากภายหลังการเสียชีวิตศพเริ่มมีการเน่า การเก็บตัวอย่างเลือดจากร่างกายทำได้ยากลำบากมากขึ้นเพราะตัวอย่างเริ่มมีการเสื่อมสภาพ สูญสลาย และอาจมีการปนเปื้อนจากภายนอก (External Contamination) ทำให้ไม่สามารถที่จะนำมาตรวจหาระดับของเอ็นไซม์ และแปลผลได้ (6, 7) การศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อที่จะทดแทนจำกัดของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเดิม ในการวินิจฉัยหาสาเหตุการเสียชีวิตเพื่อให้มีความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้นจากการศึกษาระดับ miRNA ในสัตว์ทดลองพบว่า miRNA สามารถ

ตรวจพบได้หลังการเสียชีวิต และยังคงระดับความคงตัว (Stability) ไว้ได้สูงในช่วงเวลาหลังเสียชีวิตได้นานถึง 48 ชั่วโมง (8) นอกจากนี้ยังมีการมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า miRNA ถูกหลั่งออกมาอยู่ในรูปที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) (9) ดังนั้นการตรวจหาระดับของ miRNA ในตัวอย่างเลือดศพจึงเป็นแนวทางในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันในตัวอย่างเลือดศพทางนิติเวชศาสตร์

การใช้เอนไซม์ในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน

จากข้อจำกัดของการผ่าชันสูตรศพในการวินิจฉัยของการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ในปี 2005 การศึกษาของ Susan J. Davies และคณะ (6) ได้มีการนำ Cardiac enzyme ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยคัดแยกผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันมาทดลองในตัวอย่างเลือดผู้เสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันพบว่าความจำเพาะของ Cardiac troponins ลดลง โดยผู้วิจัยรายงานว่าระดับของ Troponins ที่ลดลงนั้นตัวอย่างเลือดเกิดการปนเปื้อน และการเสื่อมสภาพสูงหลังตายจึงทำให้ในผลที่ได้ไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์กับการตายของกล้ามเนื้อหัวใจได้ นอกจากการศึกษาดังกล่าวแล้วยังมีการศึกษาของ Bao Li Zhu และคณะ (10)ในปี 2007 พบว่าระดับของ Cardiac enzyme ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยคัดแยกผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันในเลือดศพที่เสียชีวิต 48 ชั่วโมงขึ้นไปนั้น Enzyme ทั้ง 3 ชนิด (โดยเฉพาะ CK-MB) จะไม่คงที่หลังจากเสียชีวิตในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียร และความจำเพาะที่ลดลงหลังเสียชีวิตของ Cardiac enzyme ที่นำมาประยุกต์ใช้ตรวจวินิจฉัยสาเหตุการการเสียชีวิตโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ดังนั้น Cardiac enzyme จึงไม่สามารถที่จะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการระบุสาเหตุการเสียชีวิตได้

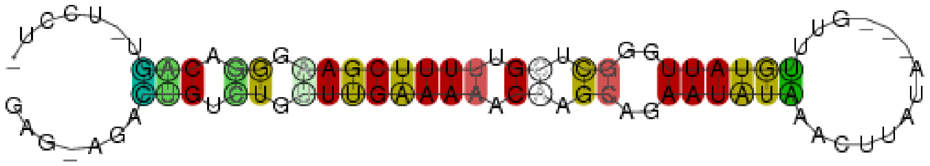
การใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิต

ทั้งนี้การศึกษา Cardiac biomarkers ในกระแสเลือดนอกจากการตรวจหาข้างต้นแล้วยังมีการศึกษาการแสดงออกของสารพันธุกรรม ภายหลังจากหลังกล้ามเนื้อหัวใจได้รับบาดเจ็บ เช่นในปี 2003 Martin Bauer และคณะได้ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ในตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน แต่การเก็บรักษา mRNA นั้นเป็นเรื่องยาก เนื่องจากตัวอย่างมีการเสื่อมสภาพ และในปี 2010 Marielle Vennemann และคณะ (11) พบว่า mRNA สามารถอยู่ในตัวอย่างได้เพียง 5-10 นาทีเท่านั้น หลังจากเสียชีวิต

ดังนั้นทั้ง Enzyme biomarkers ข้างต้นและ mRNA จึงไม่เหมาะและเป็นข้อจำกัดสำหรับการนำมาช่วยในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิต โดยเฉพาะในกรณีที่เก็บตัวอย่างเลือดในผู้เสียชีวิตเกิน

12 ชั่วโมงจากเหตุผลข้างต้น biomarkers อีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และเป็นสารพันธุกรรมที่มีความคงทนต่อเอนไซม์นิวคลิเอส (Nuclease) ทำให้สามารถอยู่รอดได้ในตัวอย่างที่เสื่อมสภาพนั้นก็คือไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA)



รูปที่ 9 *ไมโครอาร์เอ็นเอจาก (ภาพจาก http://cegg.unige.ch/mirortho/results?seed=mir-208 เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558)*

ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) คือ RNA สายสั้น ๆ ที่ถูกถอดรหัสจากจีโนมในบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน (Noncoding region) มีขนาดประมาณ 22 - 26 เบส มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนรวมถึง การเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงตัวเอง การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การตาย กระบวนการเมทาบอลิซึม และพัฒนาการของเซลล์

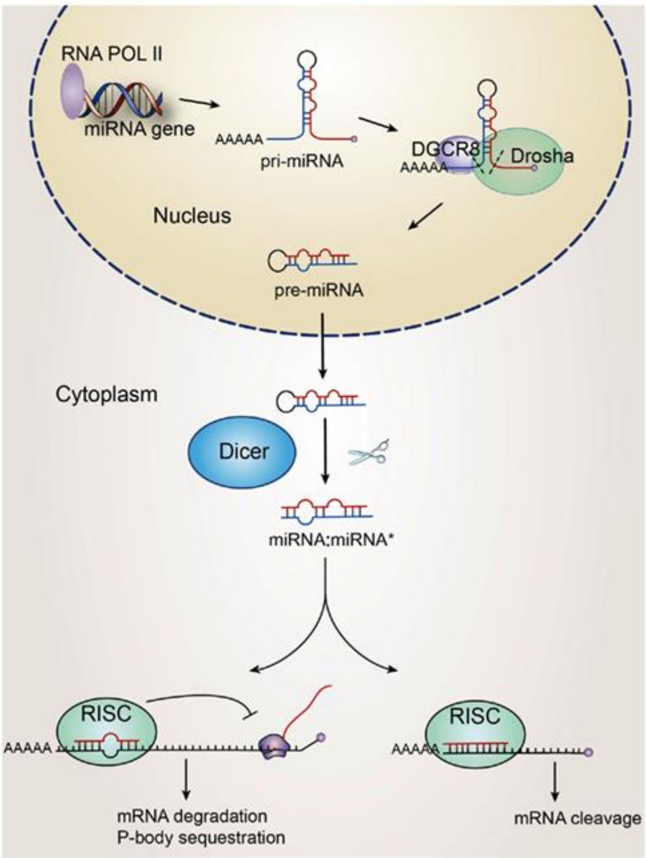
miRNA ควบคุมการทำงานของเซลล์โดยการจับเข้าที่ปลายด้าน 3’ untranslated regions (UTRs) ของเอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger RNA, mRNA) เป้าหมายแล้วยับยั้งการแปลรหัส (Translation) เป็นโปรตีน ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงมี miRNA มากกว่า 20 ชนิดที่คอยควบคุมกระบวนการให้ดำเนินไปอย่างปกติ โดยควบคุมขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง (Differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ตัวอ่อนตั้งต้นของเม็ดเลือดแดง การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการเจริญเติบโตของเซลล์

ระดับการแสดงออกของ miRNA แต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามระยะของการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการทำงานอย่างจำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย และระยะของการเจริญเติบโตหรือการพัฒนาการของเซลล์ กระบวนการควบคุมการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น miRNA มีบทบาทที่สำคัญโดยทำงานร่วมกับโปรตีนควบคุมอย่างเป็นระบบเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง เช่น โรคธาลัสซีเมีย นอกจากนี้การแสดงออกที่ผิดปกติของ miRNAอาจส่งผลให้ยีนทำงานผิดปกติและเกิดโรคในที่สุด (9, 12-16)

การสังเคราะห์ miRNA

การสังเคราะห์ miRNA (รูปที่ 10) เริ่มต้นจากในนิวเคลียสโดยมี เอนไซม์ RNA polymerase II จะทำการสร้าง primary miRNA (pri-miRNA) มีรูปร่าง hairpin-shaped โครงสร้างของ pri-miRNA นั้นประกอบไปด้วยหัว Cap ที่ปลายด้าน 5’ และ หาง poly A ที่บริเวณปลายด้าน 3’ จากนั้น pri-miRNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ Drosha ซึ่งเป็น dsRNA-specific RNase III endonuclease จะทำหน้าที่ร่วมกับ DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) ได้เป็น precursor miRNA (pre-miRNA) มีความยาวประมาณ 60-100 นิวคลีโอไทด์ pre-miRNA จะถูกส่งออกมายังไซโตพลาสซึมโดยโปรตีน Exportin-5 ต่อมาเอนไซม์ในกลุ่ม RNase III ที่ชื่อ Dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์นิวคลิเอส (Nuclease) ในไซโตพลาสซึม ทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีน TRBP (TAR-RNA binding protein) ที่สามารถจับกับ RNA สายคู่ แล้วตัด pre-miRNA ได้ microRNA สายคู่ที่มีการเข้าคู่กันแบบไม่สมบูรณ์มีความยาวประมาณ 20-25 นิวคลีโอไทด์ double-strand RNA สายสั้น ๆ นี้จะแยกออกจากกันด้วยเอนไซม์ RNA helicase สาย RNA เส้นที่มีปลายด้าน 5’ จะมีความเสถียรต่ำกว่าจึงไปรวมกับโปรตีนชนิดหนึ่งชื่อว่า Argonaute อยู่ในรูป RNA-induce silencing complex (RISC) ในขณะที่อีกสายหนึ่งจะถูกย่อยสลายไป แต่ก็มีการศึกษาที่พบว่า บางกรณี miRNA สามารถทำหน้าที่ได้ทั้งสองเส้น ซึ่งโครงสร้างสุดท้ายคือ RISC-associated miRNA complex พร้อมจะทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ mRNA ต่อไป (9, 12-15)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 10 *รูปแบบจำลองการสังเคราะห์และการทำงานของ miRNA ภายในเซลล์ (ภาพจาก <u>http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnins.2012.00013/full เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 เมษายน 2558</u>)*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

miRNA กับบทบาทที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker)

ในปัจจุบันนอกจากพบว่า miRNA เกี่ยวข้องกับกระบวนการพื้นฐานต่าง ๆ ของเซลล์ ทั้งเป็นการพัฒนาของตัวอ่อน (Fetal development) กระบวนการเมทาบอลิซึม (Metabolism) การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ (Cell differentiation) และ โปรแกรมการตายของเซลล์ (Apoptosis) miRNA ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคบางโรคในมนุษย์อีกด้วย เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคมะเร็ง และโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Acute myocardial infarction, AMI) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันซึ่งมีการศึกษาที่พบว่า miRNA ถูกปล่อยออกมาในเลือดค่อนข้างสูงเมื่อมีการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อหัวใจ (9, 12-15)

miRNA ที่แสดงออกในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ตารางที่ 3) มีหลายชนิดที่ได้รับการยืนยันว่ามีระดับการแสดงออกในตัวอย่างเลือดสูง การศึกษาของ Ali Sheikh Md Sayed และ

คณะ พบว่า miRNA ชนิด mir-133a mir-208b และ mir-499 มีความถูกต้อง และรวดเร็วในการวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดสูง(9) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ miRNA ชนิด mir-133a mir-208b และ mir-499 อย่างกว้างขวางในตัวอย่างผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เช่น การศึกษาของ Maarten F. Corsten, Chao Cheng และ กลุ่มอื่นๆ อีกหลายคณะพบว่า mir-133a mir-208b และ mir-499 มีระดับการแสดงออกในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดสูงอย่างมีนัยสำคัญทั้งสิ้น โดย mir-499 เป็น Biomarker ที่ให้ค่าทางสถิติสูงที่สุดดังนี้ค่าความไว 90% และความจำเพาะถึง 96% ความแม่นยำ 93% (17)

miRNA ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีดังนี้ mir-133a mir-208b และ mir-499 โดยการคัดเลือก miRNA มาใช้ในการศึกษานั้นจะทำการพิจารณาจากค่าความแม่นยำ (Accuracy) ความไว (Sensitivity) และ ความจำเพาะ (Sensitivity) ที่สูงที่สุดจากการศึกษาก่อนหน้าโดยรวบรวมผลของการนำ miRNA หลายชนิดไปใช้ในการคัดแยกผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดกับคนสุขภาพดี และนำผลการศึกษาที่ได้ทั้งที่เป็นผลบวกจริง (True positive) ผลบวกลวง (False positive) ผลลบจริง (True negative) และ ผลลบลวง (False positive) มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติจนได้ค่า ความแม่นยำ (Accuracy) ความไว (Sensitivity) และ ความจำเพาะ (Sensitivity)

ตารางที่ 2 miRNA ที่แสดงออกในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน

miRNA	Tissue Specific	Up/Down regulation	Reference
mir-1	Cardiac and skeletal muscles	Up	(13, 14, 18-20)
mir-133a	Smooth, cardiac and skeletal muscles	Down	(9, 14, 18-23)
mir-133b	Smooth, cardiac and skeletal muscles	Up	(9, 18)
mir-208a	Cardiac muscles	Up	(9, 14, 20)
mir-208b	Cardiac muscles	Up	(9, 17, 20, 24, 25)
mir-499	Cardiac muscles	Down	(9, 14, 17, 20, 24, 26-28)

Chulalongkorn University

miRNA กับการจำแนกชนิด

miRNA ตามธรรมชาติสามารถแบ่งได้ 2 ประเภทดังนี้

1. Circulating miRNAs

2. Tissue Specific miRNAs

miRNA ทั้งในระบบไหลเวียนเลือด (Circulating miRNAs) และในเนื้อเยื่อ (Tissue Specific miRNAs) มีระดับการแสดงออก และความจำเพาะที่แตกต่างกันออกไป และในบางชนิดนั้นอาจมีความสัมพันธ์กันอีกด้วย อาทิ เช่น การศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในมะเร็งเต้านม (Breast Cancer) ของ Peadar S. Waters และคณะในปี 2012 พบว่าระดับของ miRNA ทั้งสองชนิดมีระดับที่สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (29)

Circulating miRNAs

miRNA เมื่ออยู่ภายนอกเซลล์มีลักษณะเป็นสายเดี่ยว (Single Strand) ควบคุมการแสดงออกของยีนหลังการ Transcription (Post-Transcription) โดยจับบริเวณ 3' untranslated regions (UTRs) ของ target mRNAs เมื่อ miRNAs จับอย่างสมบูรณ์กับ target mRNA แล้ว mRNA ก็จะมีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว ขณะที่การไหลเวียนของ miRNA (Circulating miRNA) ยังมีความเสถียรและคงทนต่อ RNase นั้นก็เพราะมีหลายปัจจัยที่ปกป้อง Circulating miRNA จากการย่อยสลายโดย RNase อิสระ ตัวอย่าง เช่น ในระบบเลือด Circulating miRNA นั้นมิได้อยู่แบบอิสระหากแต่โดยปกติจะถูกบรรจุอยู่ใน Microvesicles หรือ Exosomes นอกจากนี้ Circulating miRNA ยังสามารถสร้างคอมเพล็กซ์โปรตีนเป็น protein-miRNA complexes กับ โปรตีนบางชนิด (เช่น nucleolar RNA-binding protein และ Nucleophosmin 1) เพื่อคงทนต่อการย่อยสลาย

แม้ว่า Circulating miRNA จะมีความเสถียร (Stable) แต่ขั้นตอน และเทคนิคในการ Isolation of cell-free miRNAs เพื่อให้ได้ความบริสุทธิ์สูงนั้นค่อนข้างยาก เหตุผลคือในพลาสมา (Plasma) หรือ ซีรัม (Serum) มีปริมาณ RNA ค่อนข้างต่ำ และ ความเข้มข้นของโปรตีนใน Plasma หรือ Serum อาจมีผลต่อการเตรียมตัวอย่าง และการตรวจสอบ (9, 15, 20)

Tissue Specific miRNAs

Tissue-specific miRNAs (TS miRNA) คือ miRNA ที่มีรูปแบบการแสดงออกในเนื้อเยื่อจำเพาะเจาะจง เนื่องจาก miRNA นั้นมีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนหลัง Transcription (Post-Transcription) ทำให้กระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์แล้วถูกควบคุมด้วย miRNA การแสดงออกของ miRNA มีทั้ง Up regulation และ Down regulation ซึ่งก็มีการแสดงออกของ

miRNA ตำแหน่งที่แตกต่างกันไปในแต่ละเนื้อเยื้อ ในบางกรณีพบว่าโรคบางโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์บริเวณนั้น ๆ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNA ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในโรคบางโรคได้ อาทิเช่น การศึกษาของ Claudine Seeliger และคณะ ในปี 2014 (30)พบว่าเมื่อกระดูกหัก (Osteoporotic Fractures) ระดับของ miRNA ในเนื้อเยื่อกระดูก (Bone tissue) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกเหนือจากการศึกษาดังกล่าวแล้ว การศึกษา Tissue-specific miRNAs ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดแยก สารคัดหลั่ง(Body fluid) ได้อีกด้วย เช่น การศึกษาของ Dmitry Zubakov และคณะในปี 2010 (31)แสดงให้เห็นการแสดงออกของ miRNA ที่มี Up regulation และ Down regulation แตกต่างกันใน เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิ สารคัดหลั่งจากช่องคลอด และ Menstrual blood ทำให้ miRNA นั้นนอกจากจะมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมหน้าที่ และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมีคุณสมบัติเฉพาะเซลล์ (differentiation) แล้วยังสามารถใช้ในการระบุประเภทของเนื้อเยื่อได้อีกด้วย(16, 20)

ในกลุ่มโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดมี miRNA ที่เกี่ยวข้องดังนี้

microRNA133a (mir-133a)

จากการศึกษา mir-133 มีการแสดงออกและสามารถตรวจพบได้ในกล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscles) และกล้ามเนื้อลาย (Skeletal muscles) โดย mir-133 (mir-133a และ mir133b) เป็นหลักในการควบคุมการ Phenotypic switch ของ Vascular Smooth muscle เซลล์ ซึ่งมีส่วนในทำให้เกิดภาวะ Atherosclerosis จากการศึกษาพบว่าระดับ mir-133a ในหนู rat สูงขึ้นใน 1 ชั่วโมงหลังจากมีอาการของโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน และขึ้นสูงที่สุดที่ 3 ชั่วโมงแต่ในหนู mouse ขึ้นสูงที่สุดถึง 6 ชั่วโมง mir-133 นั้นมี 2 isoforms คือ mir-133a และ mir-133b โดย mir-133b นั้นมี sequence ต่างจาก mir-133a เพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือบริเวณ 3’-terminal โดย mir-133a เป็น guanidine และ miR-133b เป็น adenosine (32)

mir-133a เป็น cardiac-specific miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเกี่ยวข้องกับ Myogenic transcription factor เช่น Mef2 MyoD myocardin และ SRF ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ส่วน mir-133b จะไม่แสดงออกใน Cardiomyocytes แต่จะไปแสดงออกในอย่างจำเพาะเจาะจงใน skeletal muscle เท่านั้น mir-133a มีบทบาทในกระบวนการ Cardiogenesis คือ mir-133a จะทำงานร่วมกับ mir-1 ในการควบคุมช่วงเริ่มต้นของ mesoderm ใน embryonic stem cell โดยทำหน้าที่ down-regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) นอกจากนี้ miR-133a ยังมีบทบาทในโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โดยการแสดงออกของ miR-133a ในเลือดของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อ

หัวใจขาดเลือดนั้นเกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจึงนิยมใช้เป็น diagnostic marker สำหรับการวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (32)

mir-133a มีคุณสมบัติ anti-apoptotic ในการบาดเจ็บของ cardiomyocytes โดยจะ overexpression เพื่อลดการเกิด cardiac cell apoptosis พบว่า miR-133a ทำหน้าที่ยับยั้ง pro-apoptotic genes เช่น caspase-9, apoptotic protease activating factor 1 (APAF1), death-associated protein kinase2 (DAPK2), BCL2-like 11 (BCL2L11), and Bcl-2-modifying factor (BMF) ในช่วงหลังการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด mir-133a ยังมีส่วนช่วยลด fibrosis ใน cardiac cell โดยจะไปบล็อกการทำงานของ pro-fibrotic genes เช่น CTGF และ collagen 1A1 อีกทั้งยังไปยับยั้ง Akt-dependent signaling mechanism ซึ่งเป็นกลไกที่นำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลว (9, 20, 22, 23, 32, 33)

ในปี 2010 Jing Ai และคณะได้สังเกตการณ์แสดงออกของ mir-133 พบว่าระดับการแสดงออกของ mir-133 ไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ผู้ที่ได้รับการรักษาแล้ว และกลุ่มควบคุมได้ ส่วนการศึกษาของ YuriD’Alessandra และคณะในปี 2013 ได้สังเกตในพลาสมาของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน 33 คน พบว่าระดับ miRNA ทั้ง mir-133a และ mir-133b เพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุดหลังมีอาการของโรคราวๆ 156 นาที การเพิ่มระดับของ mir-133a และ mir-133b สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ Troponin T (cTnT) อีกทั้งระดับการแสดงออกของ mir-133a ยังมีความสัมพันธ์กับ Troponin I จากรายงานของ Shali Chen ในปี 2014 และคณะระบุว่า mir-133a มีระดับการแสดงออกที่สูงอย่างมากในกล้ามเนื้อหัวใจระยะ fibrosis การวิเคราะห์โดยใช้ Receiver Operating Characteristic สามารถคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ ROC (Area under ROC curve) ได้ จากการศึกษา Feng Wang และคณะ ปี 2013 ระบุไว้คือ 0.918 ที่ความเชื่อมั่น 95%

ลำดับ Sequence ของ mir-133a แบบ Stem-loop

ACAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAAUCGCCUCUUCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCAACCAGCUGUAGCUAUGCAUUGA

ลำดับ sequenceของ mir-133a แบบ Mature

UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG

microRNA208b (mir-208b)

mir-208 เป็น miRNA ตัวหลักที่แสดงออกในกล้ามเนื้อหัวใจที่ encode จาก intron ของ α-myosin heavy chain gene เกี่ยวข้องกับ Cardiomyocyte Hypertrophy, Fibrosis และควบคุมการแสดงออกของ Cardiac muscles gene ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของการเพิ่มของระดับ troponin T (cTnT) mir-208b นั้นเป็น cardiac-enriched miRNA โดยมี 2 soforms คือ mir-208a และ mir-208b โดยทั้งสองถูกสังเคราะห์มาจาก Chromosome 14q11.2 โดย mir208a สังเคราะห์มาจาก intron 29 ของ MYH6 gene ที่จะ encodes ไปเป็น α-cardiac muscle myosin heavy chain (MHC) (fast myosin) ขณะที่ mir-208b สังเคราะห์มาจาก intron 31 ของ MYH7 gene ที่จะ encode ไปเป็น β-cardiac muscle MHC (slow myosin) และทั้งสองมีการแสดงออกในกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) (9, 15, 20, 25, 28, 32, 34)

mir-208 มีส่วนในกระบวนการ Cardiogenesis เช่นเดียวกับ miR-1 และ miR-133 แต่ mir-208 จะเกี่ยวข้องกับช่วง late stages ของ Cardiac development จาก myoblasts ไปเป็น cardiomyocytes โดย mir-208 จะไปควบคุมการแสดงออกของ Cardiac MHC ทำให้ miR-208 สามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัย (diagnostic marker) กล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด การแสดงออกในของ mir-208b นั้นช่วยลดอาการ infarcted heart เพื่อรักษา cardiac function ทำให้ไม่สามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของ mir-208b ได้ในเลือดของผู้ที่มิได้เป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด โดย mir-208b สามารถตรวจพบได้ในเลือดภายใน 1 ชั่วโมงหลังเกิดโรคในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันราว 90% ซึ่งเร็วกว่า troponin T ที่เป็น gold standard ในการตรวจโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดถึง 3 ชั่วโมง (troponin T สามารถตรวจพบได้ใน 3-4 ชั่วโมง และขึ้นถึงระดับสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง หลังเกิดโรค)

จากการวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic สามารถคำนวณค่า area under ROC curve ได้คือ 0.94 แสดงให้เห็นว่า mir-208b เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดี (ideal biomarker) สำหรับโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โดยที่ mir-208b ในเลือดของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดใน 12 ชั่วโมง หลังจากมีอาการแน่นหน้าอก ปี 2012 Yvan Devaux และคณะ ได้ทำการทดลองโดยใช้ mir-208b ในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันโดยมีความแม่นยำในการแยกผู้ป่วยถึง 80%

ลำดับ Sequence ของ mir-208b แบบ Stem-loop

CCUCUCAGGGAAGCUUUUUGCUCGAAUUAUGUUUCUGAUCCGAAUAUAAGACGAA CAAAAGGUUUGUCUGAGGGCAG

ลำดับ Sequence ของ mir-208b แบบ Mature

AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU

microRNA499 (mir-499)

mir-499 เป็น miRNA ที่จำเพาะต่อกล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscles) ถูกสังเคราะห์มาจากบริเวณ intron 19 ของ MYH7B gene หรือ MYH14 gene ใน chromosome 20q11.2 เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Cardiogenesis เช่นเดียวกับ mir-208 ที่ควบคุมช่วงท้ายของการบวนการ cardiogenesis และ การ differentiation ของ myoblasts ไปเป็น cardiomyocytes โดย mir-499 นั้นจะ down-regulates myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) ในการตรวจวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดเฉียบพลันนั้นเมื่อ mir-499 ถูกยับยั้งหรือถูกลดการทำงาน (deregulation) จะก่อให้เกิดโรคหัวใจโตเพราะ mir-499 มีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของ Sarcomeric genes การปรากฏของ miRNA ชนิดนี้ในกระแสเลือดจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับความเสียหายที่เกิดจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดเฉียบพลันได้ mir-499 นั้นมีส่วนให้เกิด Cardioprotective effect โดยจะป้องกันเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจไม่ให้เกิด H_2O_2-induced apoptosis ในสัตว์ทดลองพบว่าผลการแสดงออกของ mir-499 ในเซลล์หัวใจหนู rat มีส่วนในการยับยั้งกลไกการเข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์แบบ Mitochondrial Apoptosis ซึ่ง mir-499 นั้นมีเป้าหมายในการยับยั้ง Proapoptotic Regulators หลายตัว เช่น Tyrosinephosphorylation-regulated kinase 2 (Dyrk2), Programmed cell death protein 4 (Pdcd4) และ Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (Pasc2) เมื่อ mir-499 ไปจับกับ Dyrk2 เกิดเป็น mir-499-dependent Dyrk2 มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ p53 ที่เคลื่อนที่เข้าไปในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ทำให้หยุด Proapoptotic Factors (Bak, Bax, Bid) และยับยั้ง Calcineurin-Dependent dephosphorylation ของ dynaminrelated protein-1 (Drp1) ที่ก่อให้เกิด Mitochondrial Fission Program อีกด้วย (รูปภาพที่ 12) (9, 15, 17, 20, 26, 34, 35)

จากการวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic สามารถคำนวณค่า Area under ROC curve ได้คือ 0.92 และ mir-499 ยังสามารถระบุผู้ป่วยที่เป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันได้โดยที่ค่าความแม่นยำสูงถึง 93% ซึ่งสูงกว่าการตรวจโดยใช้ Biochemical marker อย่าง cTnT ที่มีความแม่นยำอยู่ที่ 88%

ลำดับ Sequence ของ mir-499 แบบ Stem-loop

GCCCUGUCCCCUGUGCCUUGGGCGGGCGGCUGUUAAGACUUGCAGUGAUGUUUAACUCCUCUCCACGUGAACAUCACAGCAAGUCUGUGCUGCUUCCCGUCCCUACGCUGCCUGGGCAGGGU

ลำดับ Sequence ของ mir-499 แบบ Mature

AACAUCACAGCAAGUCUGUGCU

การใช้ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิต

ในปี ค.ศ. 2012 นักวิจัยหลายกลุ่มค้นพบบทบาทสำคัญของ microRNA (miRNA) เมื่อกล้ามเนื้อหัวใจได้รับความเสียหายลักษณะมีระดับการแสดงออกของ miRNA ในเลือดผู้ป่วยที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ(20, 22) ดังนั้นลักษณะการแสดงออกของ miRNA จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันได้ โดยเน้นไปที่การแสดงออกของระดับ miRNA ในตัวอย่างเลือดที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน คนปกติ และกลุ่มคนที่ได้รับการรักษาแล้วได้ ทางผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะนำการแสดงออกของ miRNA ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเหตุตายจากโรคดังกล่าว แม้จะมีการศึกษาที่พบว่าในงานทางนิติวิทยาศาสตร์นั้นปัญหาส่วนใหญ่คือการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง การศึกษาของ Sophie Jones และคณะ ในปี 2012 (36) ได้ศึกษาการเก็บตัวอย่างรักษาตัวอย่างในกระดาษ FTA® ที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิต่างๆโดยเก็บตัวอย่างไว้ถึง 13 สัปดาห์ซึ่งผลการศึกษาก็ให้ผลที่น่าพอใจคือปริมาณของ miRNA ยังคงมีมากพอในการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR แม้อาจไม่ได้ประสิทธิภาพที่สูงเท่า 903 Protein Saver Card และ 3MM filter papers (มีความสามารถเก็บรักษาโปรตีน) การศึกษาในปี 2011 ของ Moon-Suhn Ryu และคณะในปี 2011 (37) ได้ศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในเลือดผู้ป่วยโรค human dietary zinc depletion โดยเก็บตัวอย่างลงในกระดาษ FTA® ซึ่งก็ไม่พบปัจจัยที่จะมายับยั้งกระบวนการ PCR แต่อย่างใด การศึกษาของ Moon-Suhn Ryu และคณะแสดงให้เห็นว่ากระดาษ FTA® เป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาเก็บตัวอย่าง ซึ่งผู้วิจัยสนใจศึกษา miRNA การเก็บตัวอย่างใน 903 Protein Saver Card และ 3MM filter papers จึงดูเกินความจำเป็นสำหรับการศึกษา ดังนั้นกระดาษ FTA® จึงเป็นตัวเลือกที่เพียงพอในการนำมาใช้เก็บรักษาตัวอย่างในการศึกษานี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองในมนุษย์

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มผู้เสียชีวิตด้วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันที่ได้รับการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตโดยวิธีการผ่าชันสูตร (Autopsy) ทั้งวิธีการผ่าศพตรวจดูด้วยตาเปล่า (Gross Examination) และ การตัดชิ้นเนื้อไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic Examination)

วิธีการวิจัย

1. **เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง**

กลุ่มวิเคราะห์ (Analytical group)

- ผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน
- ไม่จำกัดเพศ
- สัญชาติไทย
- เป็นผู้ที่เสียชีวิตในช่วงเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง

กลุ่มควบคุม (Control group)

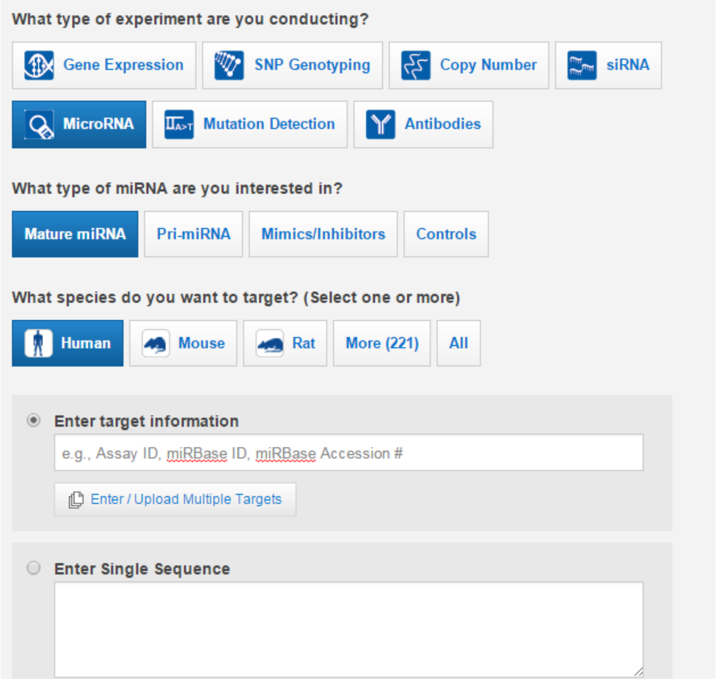
- ผู้เสียชีวิตที่ไม่ได้เสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ไม่มีการบาดเจ็บบริเวณช่องอก และไม่เคยได้รับการกู้ชีพมาก่อน
- ไม่พบประวัติโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน
- ไม่จำกัดเพศ
- สัญชาติไทย
- เป็นผู้ที่เสียชีวิตในช่วงเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง

Chulalongkorn University

2. **การคัดเลือก miRNA**

ศึกษา miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่งที่นำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ซึ่ง mir-133a mir-208b และ mir-499 เป็นตำแหน่งที่ได้รับการยืนยันว่ามีระดับการแสดงออกในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันสูง เพราะว่า mir-133a mir-208b และ mir-499 มีความสัมพันธ์กับการเกิด Atherosclerosis และ Cardiomyocyte Hypertrophy ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากมีอาการของโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด U6B ซึ่งเป็น RNA ขนาดเล็กที่นิยม

การคัดเลือก Primer และ Probe นั้นจะทำการตรวจสอบข้อมูลของ miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่ง จากเว็บไซต์ www.mirbase.org (38) และระบุ Sequence ของ miRNA แบบ mature ที่ต้องการลงบนเว็บไซต์ www.lifetechnologies.com (39) และกำหนดคุณสมบัติดังนี้ microRNA -> mature miRNA -> Human -> รหัสของ miRNA ที่ต้องการ (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 *แสดงหน้าต่างของเว็บไซต์ที่ใช้ระบุข้อมูล Sequence ของ miRNA ที่ใช้ในการศึกษา (ภาพจาก https://www.lifetechnologies.com/th/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 เมษายน 2558)*

โดย miRNA การศึกษานี้มีดังนี้

- TaqMan MicroRNA Assay, Assay ID:001352 ,mmu-miR-499
- TaqMan MicroRNA Assay, Assay ID:002246,hsa-miR-133a
- TaqMan MicroRNA Assay, Assay ID:002290,hsa-miR-208b
- TaqMan MicroRNA Assay, , Assay ID:001093,RNU6B*

* U6B เป็น non-coding small nuclear RNA (snRNA) หรือ RNA ขนาดเล็กที่นิยมนำมาใช้เป็นตัว normalize หรือ reference gene ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ซึ่ง U6B จะแสดงออกในทุก ๆ เซลล์เพราะเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการ splicing การตัด introns ในการสังเคราะห์ RNA

โดย U6B มี Sequence ดังนี้
CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT (40)

3. **การเตรียมตัวอย่างเลือด**

เก็บตัวอย่างเลือดจาก Femoral vein ใส่ในหลอดเก็บเลือดจุกสีม่วง 4 ml แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C และเก็บตัวอย่างลงบนกระดาษ FTA® โดยหยด 2-3 หยด (<125 µL ต่อ 1 inch circle, <75 µL ต่อ ¾ inch circle) ลงบนวงกลมของกระดาษ FTA® ทิ้งให้แห้งแล้วจึงเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. **ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง**

การสกัด miRNA จากตัวอย่างใช้ชุดสกัด mirVana™ PARIS™ Kit โดยทำตามขั้นตอนตาม Protocol ดังนี้ (40)

1. ตัด Blood FTA โดยการ punch ขนาด 1.2 mm ประมาณ 5-10 punch (หากเป็น whole blood ข้ามไปข้อ 4)
2. เตรียม Disruption buffer 300 µl ใน ice box เขย่าโดยการ Vortex 5 นาที เพื่อ release blood ออกจาก FTA
3. เปลี่ยนไปยัง tube ใหม่, บันทึกปริมาตรข้อ 2
4. เติม 2X Denaturing solution จำนวนเท่ากับปริมาตรในข้อ 3 เขย่าโดยการ Vortex 30-60 วินาที แล้ว Incubate บน ice box 5 นาที

5. เติม acid-phenol-chloroform จำนวนเท่ากับปริมาตรในข้อ 4 นำไป Vortex เป็นเวลา 30-60 วินาที
6. Centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. ดูดส่วนใส aqueous phase หรือ upper phase ลงในหลอดใหม่ บันทึกปริมาตร
8. เติม abs. ETOH 1.25 เท่าของปริมาตรในข้อ 7 ผสมให้เข้ากันโดยการ Vortex
9. ถ่าย lysate/ETOH (สารละลายในข้อ 8) ให้ไหลผ่าน filter cartridge (เปลี่ยนจากหลอดเดิมมาใส่ใน collection tube)ไม่เกิน 700 µl ต่อครั้ง
10. Centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำจนกว่า lysate mixture ไหลผ่าน filter จนหมด
11. ล้าง filter ด้วย Wash Solution 1 จำนวน 700 µl
12. Centrifuge เป็นเวลา 15 วินาที
13. เทส่วนใสที่ได้จากการกรองทิ้ง
14. ล้างด้วย Wash 2/3 solution จำนวน 500 µl
15. Centrifuge ประมาณ 15 วินาที
16. ล้างอีกครั้งด้วย Wash 2/3 solution และ centrifuge ประมาณ 15 วินาที
17. เติม Elution buffer ที่ 95°C จำนวน 50 µl ลงบน filter ที่บรรจุบนหลอดใหม่เพื่อชะสารตัวอย่างที่ต้องการออกจาก filter
18. Centrifuge 30 วินาที
19. ตรวจสอบปริมาณของ miRNA โดยวิธี NanoDrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm
20. เก็บสารละลายที่ -20°C ในกรณีที่ไม่ได้การวิเคราะห์ต่อในทันที

5. **ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (Reverse Transcription)**

การสังเคราะห์ cDNA จาก ตัวอย่างโดย TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังนี้ (41)

1. ผสม RT master mix ใน PCR tube ตามอัตราส่วนข้างล่างนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Component	1X
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15
Multi Scribe™ Reverse Transcriptase	1.00
10X Reverse Transcription Buffer	1.50
RNase Inhibitor	0.19
Nuclease-free water	7.16
5X RT primer	3
Total volume	**13 µl**

2. แบ่ง RT master mix ลงใน Reaction tube หลอดละ 13 µl
3. เติม RNA ที่สกัดได้จากขั้นตอนสกัด ลงใน Reaction tube 2 µl (ตัวอย่างจะต้องมีความเข้มข้นอยู่ที่ 10 ng/µl) นำไป Vortex และ Spin down
4. Incubate tube บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และเก็บบนน้ำแข็งจนกว่าจะพร้อมที่จะ load สู่เครื่อง PCR
5. ตั้ง Reaction volume ไปที่ 15.0 µl และกำหนด Program เป็น RT-PCR
6. นำ Reaction tube บรรจุลงในเครื่อง PCR
7. เริ่มการ Reverse transcription โดยใช้ Condition ตามนี้

Step	Time	Temperature
Hold	30 minutes	16 °C
Hold	30 minutes	42 °C
Hold	5 minutes	85 °C
Hold	∞	4

6. **การวัดปริมาณ cDNA (Real-time PCR)**

1. ผสม PCR reaction mix ดังนี้

Component	1X
TaqMan® Small RNA Assay	1.00
TaqMan® Universal PCR Master Mix II with UNG	10.00
Nuclease-free water	7.67
Total volume	**18.67 µl**

2. ปิเปต PCR reaction mix ลงใน 96 Well plate หลุมละ 18.67 µl
3. เติม RT-PCR product ลงใน 96 Well plate หลุมละ 1.33 µl
4. ปิด 96 Well plate โดยใช้ MicroAmp® Optical Adhesive Film หรือ MicroAmp® Optical Caps จากนั้น spin down เพื่อไล่ฟองอากาศ

5. บรรจุ 96 Well plate เข้าสู่ระบบ Real-time PCR
6. เริ่มต้นกระบวนการ Real-time PCR โดยใช้ Condition นี้

Step	Optional AmpErase® UNG activity*	Enzyme Activation	PCR	
	HOLD	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
			Denature	Anneal/extend
Temperature	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Time	2 minutes	10 minutes	15 seconds	60 seconds

7. **การรวบรวมข้อมูล (Data collection)**

การวิเคราะห์ผลจากเครื่อง Real-Time PCR ทำได้โดยการบันทึกค่า Cycle threshold หรือค่า Ct ที่ได้จากคำนวณจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ (Amplification) ของตัวอย่าง โดยค่า Ct ที่ได้จากเครื่อง Real-Time PCR นั้นจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ผลจาก Real-Time PCR จะเป็นกราฟ Amplification Curve

8. **การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)**

การวัดปริมาณด้วยวิธี real-time PCR ในการศึกษานี้จะใช้วิธี Relative quantitation ซึ่งเป็นการวัดปริมาณเพื่อหาสัดส่วนปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมายในตัวอย่างเทียบกับในตัว calibrator วิธีนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (gene expression) ปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมายจะถูก normalized ด้วยยีนอ้างอิง (reference gene) ในการศึกษานี้คือค่า Ct ของ U6b

การเปรียบเทียบโดยใช้วิธี ∆Ct จะใช้ได้เมื่อประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนของ reference gene เหมือนกับประสิทธิภาพของยีนเป้าหมาย โดยข้อมูลของตัวอย่าง และ calibrator เริ่มต้นต้องทำ normalization เพื่อลดความแปรปรวนของตัวอย่างทั้งด้านคุณภาพ และปริมาณ ซึ่งคำนวณจากสมการต่อไปนี้

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{reference}$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ค่า Ct $_{target}$ นั้นหมายถึงจำนวนรอบในการ Amplification ถ้าค่า Ct $_{target}$ สูง แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณของ target น้อย หรือในตัวอย่างนั้นมีการแสดงออกของ miRNA ต่ำ เนื่องจากการทำ Real-Time PCR จะทำ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง ค่า Ct ที่ได้จะถูกนำมาเฉลี่ยได้เป็นค่า Ct $_{target}$ จึงนำค่า Ct $_{target}$ ของทั้ง mir-133a mir-208b และ mir-499 ไป normalization กับค่า Ct $_{reference}$ จนได้ค่า ∆Ct

∆Ct ของทั้ง mir-133a mir-208b และ mir-499 หรือ Ct target ที่ผ่านการ normalization จะถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ T-test เพื่อบอกถึงระดับการแสดงออกของ miRNA ที่แตกต่างกันในตัวอย่างทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง และเลือกใช้วิธี ∆∆Ct เพื่อบอกระดับการแสดงออกของ miRNA ว่ากลุ่ม AMI มีการแสดงออกสูง หรือต่ำกว่าการแสดงออกในกลุ่มควบคุมกี่เท่า ซึ่งคำนวณจากสมการนี้

$$2^{-\Delta\Delta \mathrm{Ct}} = 2^{-(\Delta \mathrm{Ct\ AMI} - \Delta \mathrm{Ct\ control})}$$

9. **การทดสอบสมมุติฐานการวิจัย**

การเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างทั้งกลุ่มวิจัย และกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ T-test เพื่อบอกถึงระดับการแสดงออกของ miRNA ผู้วิจัยจะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยค่า Ct $_{Sample}$ ของทั้งสองกลุ่มโดยพิจารณาค่า Significant (P-value) หากมากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน หากไม่เกิน 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่างสถิติ

การทดสอบด้วย Receiver Operating Characteristic เพื่อหาค่า cut point ที่ดีที่สุดของการตรวจคืออยู่ในช่วงที่มี Sensitivity และ Specificity สูงทั้งสองค่า (13, 18, 23, 42)

- การสร้างเส้นโค้ง ROC จะเชื่อมต่อแต่ละจุดของข้อมูลซึ่งมีค่า 1 - Specificity อยู่ในแนวแกน x และ Sensitivity อยู่ในแนวแกน y เป็นเส้นตรง
- ประมาณค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC (Area Under the Curve : AUC) โดยอาศัยหลักเกณฑ์เชิงสี่เหลี่ยมคางหมู (Trapezoidal Rule) และใช้ค่า AUC เป็นตัวกำหนดค่าความแม่นยำ (Accuracy)
    - Poor Test : ROC ~ 0.5
    - Good Test : ROC ~ 1.0

การเปรียบเทียบ marker ทั้งสามตำแหน่งโดยการนำค่า Sensitivity และ Specificity ของทั้งสาม marker มาเปรียบเทียบเพื่อหา marker ที่ดีที่สุดในการศึกษานี้ และการทดสอบความเร็วในการ

ออกผลโดยเปรียบเทียบกับการผ่าชันสูตรศพทั้ง การผ่าชันสูตรด้วยตาเปล่า และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาในครั้งใช้โปรแกรมสถิติ IBM SPSS Statistics Base version 22.0 ในการประมวลผลการทดลองทั้งการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกโดยสถิติ T-test และการทำ Receiver Operating Characteristic

10. ข้อพิจารณาทางจริยธรรม (Ethical consideration)

เนื่องจากตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการทดสอบถูกจัดเก็บตามขั้นตอนปกติของการชันสูตรศพโดย แพทย์นิติเวชส่งตรวจไปห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างทั้งหมดจะไม่ระบุชื่อ- นามสกุล ตามหลักห่วงโซ่วัตถุพยาน (chain of custody) จะปรากฏเพียงรหัสการวิจัยที่ผู้วิจัยจัดทำขึ้น และจะดำเนินการทำลายตัวอย่างทันทีภายหลังจากที่โครงการดำเนินเสร็จเรียบร้อย

ผู้วิจัย และผู้ร่วมวิจัย เคารพและปฏิบัติตามหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์อย่างเคร่งครัด

- หลักความเคารพในบุคคล : การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เสียชีวิตที่ญาติอนุญาตเข้าร่วมโครงการเพื่อนำมาใช้ในการศึกษานั้นจะถูกจัดเก็บ และใช้เลขรหัสแทนที่ชื่อของผู้เสียชีวิตโดยเจ้าหน้าที่เก็บตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยจะไม่สามารถทราบชื่อหรือนามสกุลของเจ้าของตัวอย่างได้
- หลักการให้ประโยชน์ และไม่ก่อให้เกิดอันตราย : ผู้วิจัยจะรักษาผลประโยชน์ให้กับผู้เสียชีวิต โดยการป้องกันการหลุดรอดของข้อมูลเพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบในภายหลังต่อญาติของผู้เสียชีวิต ผู้วิจัยจะดำเนินการทำลายตัวอย่างทันทีหลังจากที่การศึกษาดำเนินเสร็จสิ้น
- หลักความยุติธรรม : ผู้วิจัยจะดำเนินการคัดตัวอย่างออกจากการศึกษา หากการคัดเลือกตัวอย่างจากผู้เสียชีวิตที่ญาติอนุญาตเข้าร่วมโครงการ หรือการวิเคราะห์ผลการศึกษา ไม่ถูกต้องหรือ ไม่เป็นไปตามขอบเขตของการศึกษาที่กำหนด

11. ข้อจำกัดในการทำวิจัย (Limitation)

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปอ้างอิงได้เฉพาะในผู้เสียชีวิตช่วงเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมงเท่านั้น ถ้าเป็นช่วงเวลาหลัง 12 ชั่วโมง ทางผู้วิจัยไม่สามารถบอกถึงผลของระดับการแสดงออกของ miRNA ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CHULALONGKORN UNIVERSITY

การศึกษาครั้งนี้ทำในคนที่มีสัญชาติไทยเท่านั้น ดังนั้นการแสดงออกของระดับ miRNA ในตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตสัญชาติอื่นอาจให้ผลที่แตกต่างออกไป

12. อุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to Solve the Problem)

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้น

1. เทคนิคการสกัด miRNA
2. การเสื่อมสภาพของตัวอย่าง การปนเปื้อน ของตัวอย่างที่มาถึงห้องปฏิบัติการในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง อาจมีการคลาดเคลื่อนในการระบุเวลา

มาตรการในการแก้ไข

1. เลือกชุด Kit ที่ใช้สำหรับสกัด miRNA โดยเฉพาะ ขั้นตอนการสกัดควรระมัดระวังการปนเปื้อนให้มากที่สุด
2. เก็บตัวอย่างบนกระดาษ FTA®
3. การเก็บโดยตัวอย่างจะถูกกระทำโดยผู้เชียวชาญเพื่อลดการปนเปื้อน
4. ตรวจสอบเวลาให้ชัดเจนก่อนรับตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลอง

การเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ในกลุ่มตัวอย่างกลุ่มวิจัย และกลุ่มควบคุม

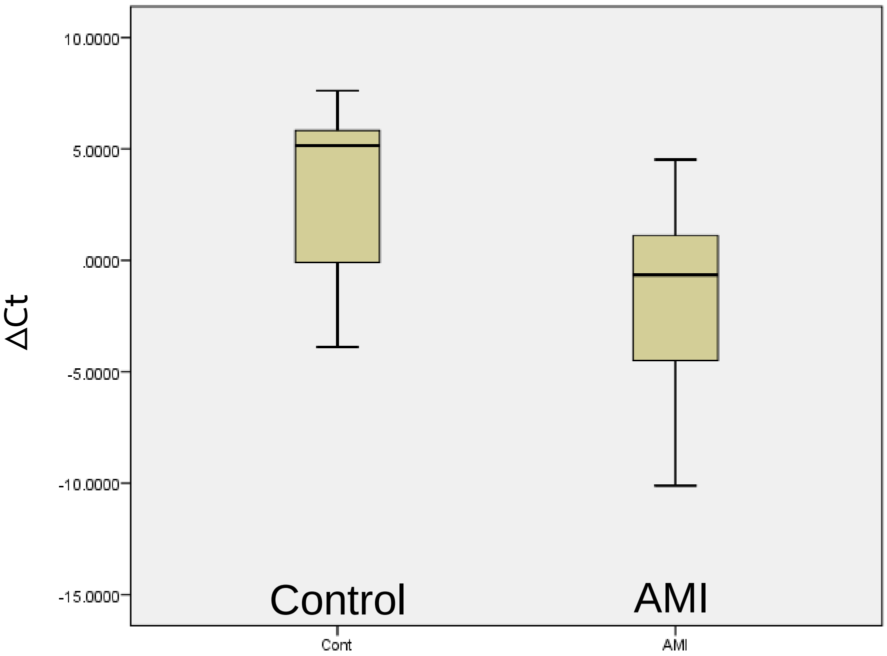
การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ miRNA 3 ตำแหน่ง คือ mir-133a mir-208b และ mir499 ในเลือดศพกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI จำนวนกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง โดยใช้ค่าเฉลี่ยของ ∆Ct นำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ T-test พบว่าในกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 3.0222 5.8739 และ 7.1872 ตามลำดับ มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) เท่ากับ 3.8292 4.2254 และ 3.2159 ตามลำดับ กลุ่ม AMI มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -1.6373 0.3625 และ 2.3785 ตามลำดับ มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 4.6968 6.1844 และ 4.3728 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ค่ามัธยฐาน (Median) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ของ mir-133a mir-208b และ mir-499 ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI

Group		miRNA		
		mir-133a	**mir-208b**	**mir-499**
Control	Mean	3.0222	5.8739	7.1872
	Median	5.1487	7.4277	6.7090
	Std. Deviation	3.8292	4.2254	3.2159
	Std. Error	1.2764	1.4085	1.0720
AMI	Mean	-1.6373	0.3625	2.3785
	Median	-0.6450	2.2268	3.9560
	Std. Deviation	4.6968	6.1844	4.3728
	Std. Error	1.4853	1.9557	1.4576

การเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-133a

ค่าเฉลี่ยของ ΔCt ของ mir-133a ในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI กลุ่มละ 10 ตัวอย่างถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ T-test พบว่าการแสดงออกของ mir-133a ในกลุ่ม AMI มีการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม (แสดงในรูปที่ 12) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P-value = 0.029 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงในตารางที่ 4



รูปที่ 12 *แผนภาพแสดงค่า ΔCt ของ mir-133a ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI โดยใช้สถิติ T-test*

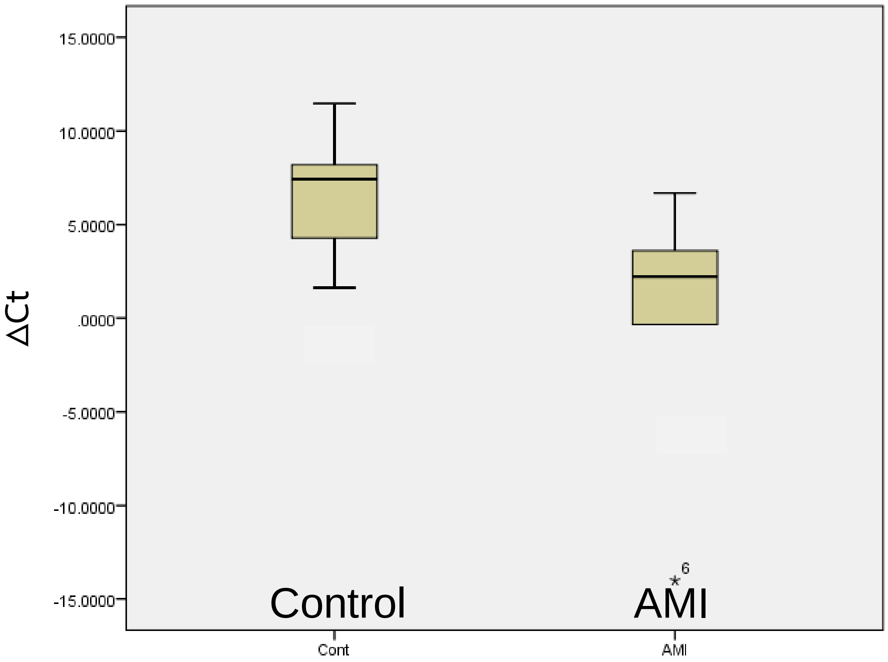
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 ตารางแสดงผลของการเปรียบเทียบค่า Ct ของ mir-133a โดยใช้สถิติ T-test

		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower
Ct	Equal variances assumed				
	Equal variances not assumed	.029	4.6595067	1.9583824	.5250307

การเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-208b

ค่าเฉลี่ยของ ΔCt ของ mir-208b ในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของ ΔCt ของ mir-208b ถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ T-test พบว่าการแสดงออกของ mir-208b ในกลุ่ม AMI มีการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม (แสดงในรูปที่ 13) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P-value = 0.036 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 13 *แผนภาพแสดงค่า ΔCt ของ mir-208b ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI โดยใช้สถิติ T-test*

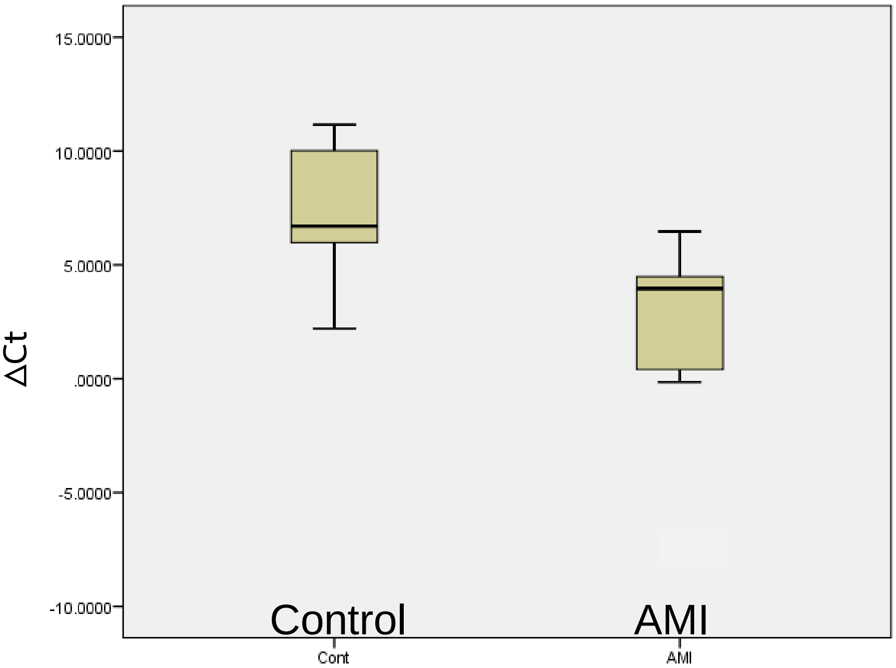
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 5 ตารางแสดงผลของการเปรียบเทียบค่า Ct ของ mir-208b โดยใช้สถิติ T-test

		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower
Ct	Equal variances assumed				
	Equal variances not assumed	.036	5.5113744	2.4100860	.4005190

การเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-499

ค่าเฉลี่ยของ ΔCt ของ mir-499 ในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของ ΔCt ของ mir-499 ถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ T-test พบว่าการแสดงออกของ mir-499 ในกลุ่ม AMI มีการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม (แสดงในรูปที่ 14) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P-value = 0.018 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงในตารางที่ 6



รูปที่ 14 *แผนภาพแสดงค่า ΔCt ของ mir-499 ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่ม AMI โดยใช้สถิติ T-test*

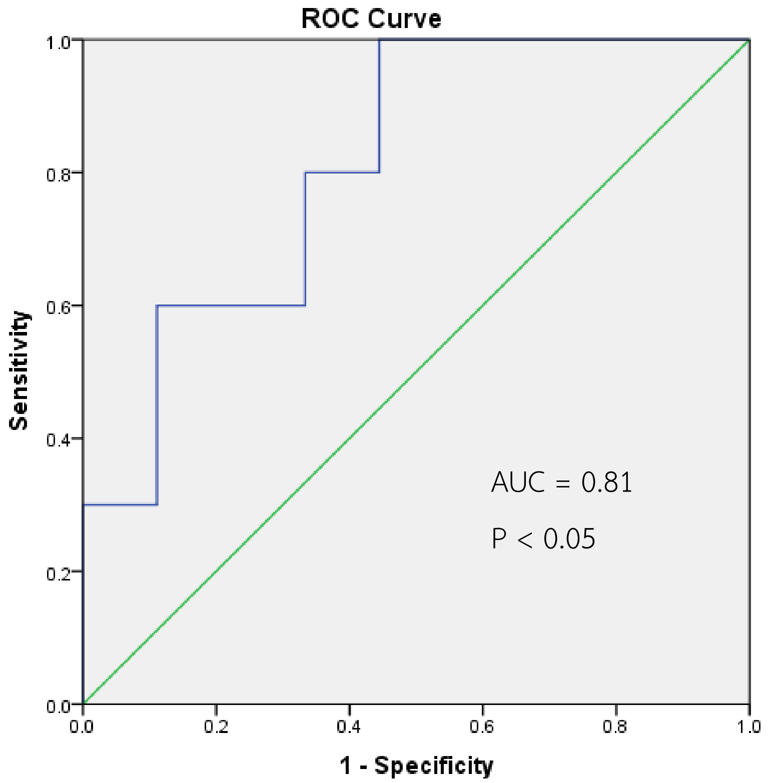
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 6 ตารางแสดงผลของการเปรียบเทียบค่า Ct ของ mir-208b โดยใช้สถิติ T-test

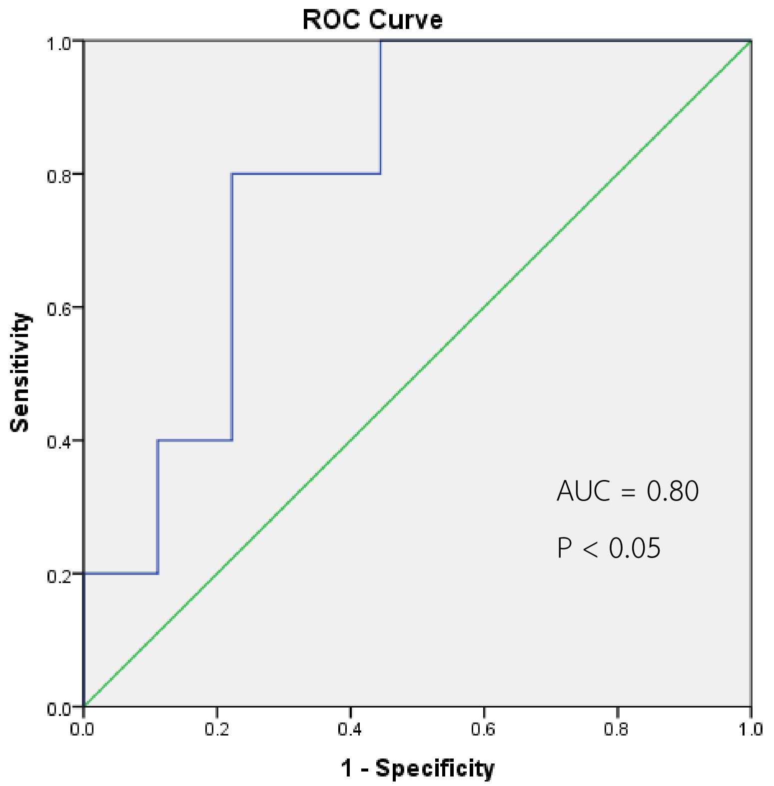
		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
					Lower
Ct	Equal variances assumed				
	Equal variances not assumed	.018	4.8087000	1.8093353	.9452187

การทดสอบด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC)

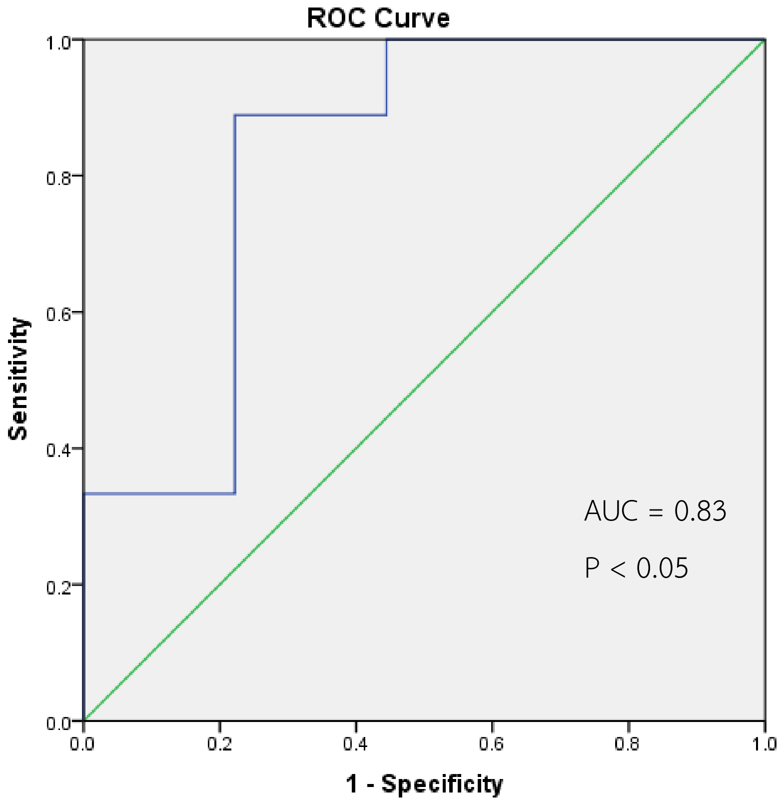
การทดสอบความสามารถในการพยากรณ์ผลของชุดตรวจด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC) เพื่อหาค่าจุดตัดหรือ cut point ที่ตัดในช่วงที่มีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจสูงทั้งสองค่า โดย mir-133a mir-208b และ mir-499 มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ หรือ Area under curve (AUC) อยู่ที่ 0.81 0.80 และ 0.83 ตามลำดับ มีค่าความไวเท่ากับ 80% 80% และ 89% ตามลำดับ และมีค่าความจำเพาะเท่ากับ 67% 78% และ 78% ตามลำดับ (แสดงในรูป 15, 16, 17)



รูปที่ 15 *รูปภาพแสดง Receiver Operating Characteristic (ROC) ของ mir-133a*



รูปที่ 16 *รูปภาพแสดง Receiver Operating Characteristic (ROC) ของ mir-208b*



รูปที่ 17 *รูปภาพแสดง Receiver Operating Characteristic (ROC) ของ mir-499*

อัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR (%PCR Success Rate)

กระบวนการทำ qPCR หรือ Real-time PCR เป็นขั้นตอนหลังจากการทำ RT-PCR ซึ่งได้ผลผลิตเป็น cDNA เพื่อเป็นการวัดปริมาณของ cDNA เริ่มต้นที่พบในตัวอย่าง การทำ Real-time PCR ในหนึ่งตัวอย่างนั้นจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ การศึกษาครั้งนี้พบว่า U6b ขึ้นทั้ง 3 ซ้ำ 16 ตัวอย่าง (แสดงในตารางที่8) mir-133a ขึ้นทั้ง 3 ซ้ำ 19 ตัวอย่าง (แสดงใน ตารางที่9) mir-208b ขึ้นทั้ง 3 ซ้ำ 15 ตัวอย่าง (แสดงใน ตารางที่10) และ mir-499 ขึ้นทั้ง 3 ซ้ำ 14 ตัวอย่าง (แสดงใน ตารางที่11) คิดเป็นอัตราความสำเร็จในการทำ qRT-PCR ได้ 80% 95% 75% และ 70% ตามลำดับ

ตารางที่ 7 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ (%PCR Success Rate) qRT-PCR ของ U6b

	กลุ่ม		
จำนวนซ้ำ	AMI	Control	%PCR
3	7	9	80
2	3	1	15
1	0	0	0
0	0	0	0

ตารางที่ 8 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ (%PCR Success Rate) qRT-PCR ของ mir-133a

	กลุ่ม		
จำนวนซ้ำ	AMI	Control	%PCR
3	10	9	95
2	0	1	5
1	0	0	0
0	0	0	0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ (%PCR Success Rate) qRT-PCR ของ mir-208b

	กลุ่ม		
จำนวนซ้ำ	AMI	Control	%PCR
3	6	9	75
2	4	0	20
1	0	1	5
0	0	0	0

ตารางที่ 10 แสดงอัตราความสำเร็จในการทำ (%PCR Success Rate) qRT-PCR ของ mir-499

	กลุ่ม		
จำนวนซ้ำ	AMI	Control	%PCR
3	4	10	70
2	3	0	15
1	2	0	10
0	1	0	5

ความสัมพันธ์ระหว่าง อายุ เพศ สาเหตุการเสียชีวิต ช่วงเวลาเสียชีวิต

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าผู้เสียชีวิตทั้งหมดในกลุ่ม AMI เป็นเพศชาย มีช่วงอายุตั้งแต่ 25-60 ปี (แสดงใน ตารางที่ 11) ผู้เสียชีวิตในกลุ่ม Control เป็นเพศชาย 8 คน และเป็นเพศหญิง 2 คน มีช่วงอายุตั้งแต่ 14-75 ปี (แสดงใน ตารางที่ 12) โดยช่วงเวลาเสียชีวิตส่วนใหญ่ในกลุ่ม AMI และกลุ่ม Control คือ 0.5-2 ชั่วโมง และ 2-4 ชั่วโมง ส่วนระดับการแสดงออกของ miRNA ที่ผ่านการคำนวณ ∆Ct ในกลุ่ม AMI (แสดงใน ตารางที่ 11) มีระดับการแสดงออกของ mir-133a mir-208b และ mir-499 คิดเป็นค่าเฉลี่ยอยู่ที่ -1.6373 0.3626 และ 2.3785 ตามลำดับ มี ∆Ct ต่ำสุดอยู่ที่ -10.1125 -14.0140 และ -7.6725 ตามลำดับ มีค่า ∆Ct สูงสุดอยู่ที่ 4.5137 6.6922 และ 6.4620 ตามลำดับ กลุ่ม Control (แสดงใน ตารางที่ 12) มีระดับการแสดงออกของ mir-133a mir-208b และ mir-499 คิดเป็นค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 2.0501 4.7222 และ 6.5466 ตามลำดับ มี ∆Ct ต่ำสุดอยู่ที่ -6.6945 -5.6433 และ 0.7813 ตามลำดับ มีค่า ∆Ct สูงสุดอยู่ที่ 7.6093 11.4677 และ 11.1627 ตามลำดับ

ตารางที่ 11 แสดงการข้อมูล อายุ เพศ สาเหตุการเสียชีวิต ช่วงเวลาเสียชีวิต และ ∆Ct ของกลุ่ม AMI

Case No.	Gender	Age	Descriptive data	PMI(hr.)	∆Ct		
					133a	208b	499
A1	ช	50	-	1-6	2.5357	1.0023	6.4620
A2	ช	46	-	2	4.5137	2.1513	3.9560
A3	ช	42	-	2	-1.0513	3.6083	-
A4	ช	59	-	0.5-2	-8.4877	2.3023	0.4065
A5	ช	57	-	2-4	0.8887	5.2563	5.9543
A6	ช	32	-	0.5-2	-10.1125	-14.0140	-7.6725
A7	ช	60	-	0.5-2	1.1218	6.6922	4.2840
A8	ช	36	-	4-6	-0.4393	3.3783	3.6797
A9	ช	25	-	6-12	-0.8508	-0.3280	4.4808
A10	ช	42	-	0-1	-4.4917	-6.4233	-0.1440
Average ∆Ct					-1.6373	0.3626	2.3785

ช คือ เพศชาย

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูล อายุ เพศ สาเหตุการเสียชีวิต ช่วงเวลาเสียชีวิต และ ∆Ct ของกลุ่ม Control

Case No.	Gender	Age	Descriptive data	PMI(hr.)	∆Ct		
					133a	208b	499
C1	ญ	33	ตกที่สูง	2-3	1.7480	1.6167	6.4353
C5	ช	75	อุบัติเหตุ	2-4	5.8690	8.2010	11.1627
C6	ช	31	แขวนคอ	8-12	7.6093	4.4307	10.2727
C7	ญ	14	ตกที่สูง	0.5-2	-0.1027	4.2717	2.8457
C8	ช	43	อุบัติเหตุ	1-2	5.1487	7.4580	9.0520
C9	ช	34	ตกที่สูง	2-3	5.8380	7.4277	10.0163
C10	ช	27	อุบัติเหตุ	รพ	-3.8843	-1.9780	2.2017
C11	ช	-	เลือดออกในสมอง	8-12	-0.3457	9.9700	5.9897
C12	ช	46	เลือดออกในสมอง	2-4	-6.6983	-5.6433	0.7813
C13	ช	73	ตกที่สูง	2-4	5.3192	11.4677	6.7090
Average ∆Ct					2.0501	4.7222	6.5466

ช คือเพศชาย และ ญ คือเพศหญิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

วิจารณ์ผลการทดลอง

ระดับการแสดงออกของ miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่งในตัวอย่างเลือดศพทางนิติเวชศาสตร์ถูกนำมาคำนวณด้วยวิธี ΔCt และเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ T-test พบว่า กลุ่ม AMI และกลุ่มควบคุมมีความการแสดงออกของ miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่ง ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% คือมีค่า $P<0.05$

ระดับการแสดงออกของ mir-133a ในกลุ่ม AMI มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 12.8836 เท่า เมื่อคำนวณด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ส่วนการทดสอบความสามารถในการพยากรณ์ผลของชุดตรวจด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC) พบว่ามีค่า Area under curve (AUC) อยู่ที่ 0.81 ค่า sensitivity เท่ากับ 80% และ specificity เท่ากับ 67% ที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในทางคลินิกก่อนหน้านี้ของ Feng Wang และคณะ (23)ที่ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของ mir-133a ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดเฉียบพลันกับกลุ่มควบคุม ที่เป็นเช่นนั้นก็เพราะ mir-133a มีกลไกในการยับยั้ง หรือ Down Regulate Caspase-9 (CASP9) และ Apoptotic Protease Activating Factor 1 (APAF1) ซึ่งเป็นโปรตีนตัวหลักในโปรแกรมการตายของเซลล์แบบ Apoptosis จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นสรุปว่าระดับการแสดงออกของ mir-133a สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างเลือดหลังการเสียชีวิตใน 12 ชั่วโมง และยังให้ผลการแสดงออกที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในทางคลินิก

mir-208b มีระดับการแสดงออกในกลุ่ม AMI สูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับ mir-133a เมื่อคำนวณด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ได้ 1.5934 เท่า การทดสอบความสามารถในการพยากรณ์ผลของชุดตรวจด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC) พบว่ามีค่า Area under curve (AUC) อยู่ที่ 0.80 ค่า sensitivity เท่ากับ 80% และ specificity เท่ากับ 78% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสูงกว่า mir-133a ที่มีค่า specificity เพียง 67% อีกทั้งผลการเปรียบเทียบของสองกลุ่มยังสอดคล้องกับผลการศึกษาทางคลินิกของ Chencheng Li และคณะ ในปี 2015 (20) ที่พบว่า miRNA ตำแหน่ง mir-208b มีระดับการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดเฉียบพลันสูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่เป็นคนสุขภาพดี ที่เป็นเช่นนั้นก็เพราะ mir-208b ทำหน้าที่ควบคุม Cardiac muscles gene ในการสังเคราะห์ myosin heavy chain ในกล้ามเนื้อหัวใจเมื่อหัวใจได้รับความเสียหาย mir-208b จะ Up-Regulate เพื่อรักษาการหน้าที่ของกล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac Function)

เอาไว้ จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถยืนยันได้ว่ายังคงพบระดับการแสดงออกในตัวอย่างเลือดหลังการเสียชีวิตใน 12 ชั่วโมงอีกด้วย

ระดับการแสดงออกของ mir-499 ที่พบในตัวอย่างกลุ่ม AMI และกลุ่มควบคุมเมื่อนำไปเปรียบเทียบระดับการแสดงออกด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ พบว่า กลุ่ม AMI มีระดับการแสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.7353 เท่า การทดสอบความสามารถในการพยากรณ์ผลของชุดตรวจด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC) พบว่ามีค่า Area under curve (AUC) อยู่ที่ 0.80 ค่า sensitivity เท่ากับ 89% และ specificity เท่ากับ 78% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สูงกว่า miRNA 2 ตำแหน่งก่อนหน้าคือ mir-133a และ mir-208b จากการศึกษาทางคลินิกในปี 2015 ของ Xian Liu และคณะ (34)พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงของ miRNA ตำแหน่ง mir-499 จะมีระดับการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดเฉียบพลันสูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่เป็นคนสุขภาพดีโดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) โดยการคำนวณ Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis เท่ากับ 0.88 ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษานี้นั้นก็เพราะการแสดงออกของ mir-499 ในกระแสเลือดนั้นมีหน้าที่ในการยับยั้ง Proapoptotic Regulators หลายตัว เช่น Tyrosinephosphorylation-regulated kinase 2 (Dyrk2), Programmed cell death protein 4 (Pdcd4) และ Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (Pasc2) เมื่อ mir-499 ไปจับกับ Dyrk2 เกิดเป็น mir-499-dependent Dyrk2 มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ p53 ที่เคลื่อนที่เข้าไปในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ทำให้หยุด Proapoptotic Factors (Bak, Bax, Bid) และยับยั้ง Calcineurin-Dependent dephosphorylation ของ dynaminrelated protein-1 (Drp1) ที่ก่อให้เกิด Mitochondrial Fission ซึ่งจากผลการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นอีกว่าระดับการแสดงออกของ mir-499 ยังคงสามารถถูกตรวจพบได้ในตัวอย่างเลือดแม้จะเป็นช่วงหลังเสียชีวิตแล้วถึง 12 ชั่วโมง

ประสิทธิผลของระดับการแสดงออกของ miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่งทั้ง mir-133a mir-208b และ mir-499 ที่ได้ในการศึกษา มีเพียง mir-133a เท่านั้นที่ไม่เพียงพอจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้เหตุเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (AMI) ในตัวอย่างทางนิติเวชศาสตร์ ส่วน miRNA อีกสองตำแหน่ง ให้ผลการทดสอบความสามารถในการพยากรณ์ผลของชุดตรวจด้วย Receiver Operating Characteristic (ROC)ในกลุ่ม AMI และกลุ่มควบคุมที่ดีกว่า แต่ %PCR Success Rate หรืออัตราความสำเร็จการทำ qRT-PCR นั้นทั้ง mir-208b และ mir-499 น้อยกว่า mir-133a ที่ให้อัตราความสำเร็จถึง 95% ซึ่ง mir-208b และ mir-499 มีอัตราความเสร็จเพียง 75% และ 70% ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าแม้ mir-133a อาจไม่เพียงพอจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้เหตุเสียชีวิตจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (AMI) ในตัวอย่างทางนิติเวชศาสตร์ แต่ mir-133a สามารถให้ผลในตัวอย่างที่ mir-208b และ mir-499 ไม่สามารถให้ผลได้

ดังนั้นระดับการแสดงออกของ mir-133a สามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งเพื่อประกอบการตัดสินใจในการวินิจฉัยเหตุที่นำไปสู่การเสียชีวิตหากผลของ mir-208b และ mir-499 มีปัญหาได้ miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่งเมื่อถูกนำมาใช้ร่วมกันผู้วิจัยเชื่อว่าสามารถให้ประสิทธิผลสูงสุดในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตได้ แม้จะยังมีข้อจำกัดอยู่บ้างแต่การศึกษานี้เป็นการเพิ่มทางเลือกในอนาคตที่จะนำการศึกษาการแสดงออกของ miRNA มาใช้ในตัวอย่างทางนิติเวชศาสตร์ได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาข้างต้นถึงแม้ miRNA ทั้ง 3 ตำแหน่ง mir-133a mir-208b และ mir-499 จะมีค่า sensitivity เท่ากับ 80% 80% 89% ตามลำดับ แต่ค่า specificity ยังไม่สูงมากนักโดยเฉพาะ mir-133a จึงควรมีการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA เพิ่มเติมในตำแหน่งอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ครอบคลุมถึงปัจจัยที่เป็นเหตุของโรคมากขึ้น

ในส่วนค่า ΔCt ของกลุ่ม AMI ที่แสดงในตารางที่ 11 และตารางที่ 12 นั้น เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาเสียชีวิตแม้จะมีระดับการแสดงออกของ miRNA ที่ความแตกต่างกับกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับของการแสดงออกของ miRNA ในแต่ระช่วงเวลาต่างๆ หลังตายมีระดับลดลงในช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น จึงควรมีการเพิ่มการศึกษาช่วงเวลาเสียชีวิตกับระดับการแสดงออกในการศึกษาต่อไป

การศึกษานี้กลุ่มตัวอย่างทั้งหมดมาจากเลือดศพของผู้มีสัญชาติไทยเพียงเท่านั้น ในการศึกษาในอนาคตหากต้องการนำไปประยุกต์ใช้ในเขตพื้นที่อื่น ควรทดลองในตัวอย่างเลือดศพในสัญชาติอื่นอาจให้ผลการแสดงออกที่แตกต่างออกไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2014;129:e28-e292.

2. กระทรวงสาธารณสุข สก. จำนวนผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดในประเทศไทย 2014. Available from: http://thaincd.com/information-statistic/non-communicable-disease-data.php.

3. Kumar V, Jon C. Aster, James A. Perkins. Robbins Basic Pathology. Philadelphia, PA 19103-28992013. Available from: www.elsevier.com/permissions.

4. วิไล พัววิไล, สุดารัตน์ ตันสุภสวัสดิกุล, ดำรัส ตรีสุโกศล, บรรหาร กออนันตกูล, สุรพันธ์ สิทธิสุข, ภาวิทย์ เพียรวิจิตร, และคณะ. แนวทางเวชปฏิบัติการวินิจฉัยและรักษาโรคหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด2000.

5. สุรีย์ เลขวรรณวิจิตร. พยาธิวิทยาของโรคหัวใจ. โรงพิมพ์คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่2013.

6. Davies SJ, Gaze DC, Collinson PO. Investigation of cardiac troponins in postmortem subjects: comparing antemortem and postmortem levels. The American journal of forensic medicine and pathology. 2005;26:213-5.

7. Batalis NI, Marcus BJ, Papadea CN, Collins KA. The role of postmortem cardiac markers in the diagnosis of acute myocardial infarction. Journal of forensic sciences. 2010;55:1088-91.

8. Wang H, Mao J, Li Y, Luo H, Wu J, Liao M, et al. 5 miRNA expression analyze in post-mortem interval (PMI) within 48 h. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4:e190-e1.

9. Sayed AS, Tian-Lun Yang, and Jun Peng. Circulating microRNAs: A Potential Role in Diagnosis and Prognosis of Acute Myocardial Infarction. Hindawi Publishing Corporation. 2013;Volume 35 (2013):561–6.

10. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Bessho Y, et al. Postmortem cardiac troponin I and creatine kinase MB levels in the blood and pericardial fluid as markers of myocardial damage in medicolegal autopsy. Legal medicine. 2007;9:241-50.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

11. Vennemann M, Koppelkamm A. Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations. Forensic Sci Int. 2010;203:76-82.

12. Panyasai S. MicroRNA : Biosynthesis function and the important role in erythropoiesis. JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY. 2012; 24:3-9.

13. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun. 2010;391:73-7.

14. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. European heart journal. 2010;31:659-66.

15. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). J Mol Cell Cardiol. 2016;94:107-21.

16. Runglawan Silakit NN. Plama MicroRNAs: a Biomarker for Cancer Diagnosis. Srinagarind Med J. 2012;2012: 27(3):310-6.

17. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. Circ Cardiovasc Genet. 2010;3:499-506.

18. Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. Cardiology. 2010;115:163-9.

19. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. Circ Cardiovasc Genet. 2011;4:446-54.

20. Li C, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction. Clin Biochem. 2012;45:727-32.

21. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. Genes & development. 2008;22:3242-54.

22. Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, Bretthauer J, Anker SD, Pinet F, et al. Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. Int J Cardiol. 2013;168:1837-40.

23. Wang F, Chunxia Zhao, Huaping Li, Sandip Chaugai, Yan Wang, Chen Chen, and Dao Wen Wang. Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis. Journal of Translational Medicine. 2013:11:222.

24. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. Clinical Chemistry. 2012:559–67.

25. Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S, et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. International journal of molecular sciences. 2014;15:5774-88.

26. Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. Clin Chem. 2010;56:1183-5.

27. Matkovich SJ, William H Eschenbacher, Lisa E Dorn, and Gerald W Dorn II. Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy. NIH Public Access. 2012:521–31.

28. Xiao J, Shen B, Li J, Lv D, Zhao Y, Wang F, et al. Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction. International journal of clinical and experimental medicine. 2014;7:136-41.

29. Waters PS, McDermott AM, Wall D, Heneghan HM, Miller N, Newell J, et al. Relationship between Circulating and Tissue microRNAs in a Murine Model of Breast Cancer. PLoS ONE. 2012;7:e50459.

30. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2014;29:1718-28.

31. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and

quantitative RT-PCR confirmation. International journal of legal medicine. 2010;124:217-26.

32. Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Hayashi H, Ochiai E, Osawa M. MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart. Int J Cardiol. 2016;211:43-8.

33. Chen S, Puthanveetil P, Feng B, Matkovich SJ, Dorn GW, Chakrabarti S. Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2014;18:415-21.

34. Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, et al. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. Exp Gerontol. 2015;72:230-8.

35. Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. Nat Med. 2011;17:71-8.

36. Jones S, Sutherland CJ, Hermsen C, Arens T, Teelen K, Hallett R, et al. Filter paper collection of Plasmodium falciparum mRNA for detecting low-density gametocytes. Malaria journal. 2012;11:266.

37. Ryu MS, Langkamp-Henken B, Chang SM, Shankar MN, Cousins RJ. Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108:20970-5.

38. mirbase@manchester. mirbase Faculty of Life Sciences University of Manchester2015. Available from: http://www.mirbase.org/search.shtml.

39. lifetechnologies. Assay Search Tool - Find & Buy Your Single Tube TaqMan® Assays. 2015.

40. mirVana™ PARIS™ Kit [Internet]. 2011. Available from: www.appliedbiosystems.com/support.

41. TaqMan® Universal PCR Master Mix User Guide [Internet]. 2014. Available from: https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4304437.

42. Li YQ, Zhang MF, Wen HY, Hu CL, Liu R, Wei HY, et al. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. Clinics (Sao Paulo). 2013;68:75-80.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ข้อมูลของผู้วิจัยหลัก

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายปรัชญ มีนาทุ่ง

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Prachaya Menathung

รหัสประจำตัวนิสิต 567 41025 30

วัน/เดือน/ปี เกิด 11 ธันวาคม 2532

สถานที่เกิด จังหวัดสงขลา

นิสิตหลักสูตร/สาขาวิชา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

สังกัดภาควิชา ภาควิชานิติเวชศาสตร์

การศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ทุนวิจัย ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการขับเคลื่อนการวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (Special Task Force for Activating Research (STAR) กลุ่มการวิจัยนิติพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University