

โพลีมอร์ฟิซึมของยีนทรอมโบโมดูลินชนิด -33GA ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจชาวไทย

นุชนาฏ สิทธิเดชผจญ¹, นันทรัตน์ โสมมานะสิน^{2,8}, นงนุช เศรษฐสุเสถียร^{3,8}, ชาตรี เศรษฐสุเสถียร^{4,8},
ยุพา คู่คงวิริยพันธ์^{5,8}, พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร^{6,8}, วิชัย เส้นทอง^{7,8}

¹สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁶ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁷ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁸กลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Thrombomodulin Gene -33GA Polymorphism in Thai Patients with Coronary Artery Disease

Nutchanart Sittidedpachone¹, Nantarat Komanasin^{2,8}, Nongnuch Settasatian^{3,8}, Chatri Settasatian^{4,8},
Upa Kukongwiriyan^{5,8}, Pongsak Intharapetch^{6,8}, Vichai Senthong^{7,8}

¹Medical Science, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

²Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

³Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

⁵Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

⁶Queen Sirikit Heart Center of the Northeast Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

⁷Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

⁸Cardiovascular Research Group, Khon Kaen University

หลักการและวัตถุประสงค์: ทรอมโบโมดูลินเป็นไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์เอนโดทีเลียลที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการรักษาสสมดุลของระบบห้ามเลือด ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และต้านการอักเสบ ซึ่งหากปริมาณทรอมโบโมดูลินบนผิวเซลล์เอนโดทีเลียลลดลงและหลุดลอยไปในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นจะเห็นยวนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งและนำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ห้อนุমানพบว่าโพลีมอร์ฟิซึมของยีนทรอมโบโมดูลินชนิด -33GA (TM -33GA) มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ

Background and Objective: Thrombomodulin (TM) is an endothelial cell-expressed glycoprotein which is an essential cofactor that impacts on a process of haemostatic balance, negative mitogenic effect on proliferating cell and anti-inflammation. A decreased expression of TM on the endothelial cell surface and an increase in its soluble forms in plasma may therefore contribute to atherosclerosis leading to coronary artery disease (CAD). Meta-analysis on the association between thrombomodulin gene

*Corresponding author: Nantarat Komanasin, Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, E-mail : nankom@kku.ac.th

ในชาวเอเชีย แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์งานในคนไทย การศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับโรคหลอดเลือดหัวใจ ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและความรุนแรงของโรค

วิธีการศึกษา: เป็นการศึกษาแบบ case-control study โดยศึกษาในอาสาสมัครที่มีอาการเข้าข่ายเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ และเข้ารับการรักษาโดยการฉีดสตีลหลอดเลือดหัวใจเพื่อประเมินการตีบของหลอดเลือด ที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 327 ราย จากผลการฉีดสตีลหลอดเลือดหัวใจได้แบ่งอาสาสมัครเป็นกลุ่มผู้ที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจจำนวน 197 ราย และกลุ่มควบคุมซึ่งได้แก่ผู้ที่ไม่มีการตีบของหลอดเลือดหัวใจหลักมากกว่าร้อยละ 50 จำนวน 130 ราย ประเมินความรุนแรงของโรคด้วยจำนวนเส้นของหลอดเลือดที่ตีบ และค่า Gensini score แล้วตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism (PCR-RFLP)

ผลการศึกษา: พบว่าความถี่จีโนไทป์ GG+GA ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจและกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 8.1 และ 8.5) มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.855$) และเมื่อเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ระหว่างผู้ที่มีและไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดผิดปกติ เบาหวาน อ้วน และการสูบบุหรี่ และเปรียบเทียบระหว่างผู้ที่มีจำนวนเส้นของหลอดเลือดที่ตีบแตกต่างกันรวมทั้งระหว่างผู้ที่มี Gensini score สูงและต่ำ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

สรุป: โพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA ในคนไทยไม่มีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจ ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค

polymorphism and CAD has revealed the association of TM -33GA polymorphism in Asian populations. However, this relationship has not been done in Thai patients. This study therefore aimed to investigate the relationship between TM -33 GA polymorphism and CAD as well as CAD risk factors and severity of the disease.

Methods: A total of 327 case-control study was carried out in subjects who were clinically suspected of having CAD and were undergoing coronary angiography at Queen Sirikit Heart Center of the Northeast Hospital, Khon Kaen University. Based on angiographic results, 197 subjects were classified as CAD and 130 subjects with normal coronary artery or less than 50% stenosis were control group. The number of stenosis vessels and Gensini scoring system were used to evaluate coronary artery stenosis severity. TM -33GA gene polymorphism was determined using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique.

Results: The frequency of TM -33 GA+GA genotype between CAD and control group (8.1 vs 8.5%) was not significantly different ($p=0.885$). Moreover, the significant differences of the genotype distribution were not found when compared between the subjects with and without CAD risk factors including hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, obesity and smoking. In addition, significant differences when compared between the patients with different number of disease vessel and Gensini score were not found.

Conclusions: The results of this study may suggest that there is no association between TM -33 GA polymorphism with CAD, CAD risk factors and the severity of the disease in Thai.

ศรีนครินทร์เวชสาร 2558; 30 (6): 543-551 ♦ Srinagarind Med J 2015; 30 (6): 543-551

บทนำ

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) เป็นสาเหตุของการตายอันดับหนึ่งของประชากรทั่วโลก¹ และเป็นอันดับที่ 4 ของประชากรไทย² โดยมีปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ ได้แก่ พันธุกรรม เพศ อายุ โรคความดันโลหิตสูง

ภาวะอ้วน การมีไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน และการสูบบุหรี่ ซึ่งพยาธิสภาพที่นำไปสู่การเกิด CAD คือ ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) โดยปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดังกล่าวได้แก่ การทำงานที่ผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell) ที่บุผนังของหลอดเลือด การอักเสบ

ความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือดและการละลายลิ่มเลือด³⁻⁵

ทรอมโบโมดูลิน (thrombomodulin; TM) เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ที่เมมเบรน (membrane) ของเซลล์เอนโดทีเลียล (gene) ที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนอยู่บนโครโมโซมแขนข้างสั้นคู่ที่ 20 ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ต้านการสลายลิ่มเลือด (antifibrinolysis) ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และต้านการอักเสบ ซึ่งทำให้เกิดความสมดุลในระบบการห้ามเลือด (hemostasis) และป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด (thrombosis)⁶ โพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของจีน TM ชนิด -33GA (TM -33GA) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นที่ส่วนของโปรโมเตอร์ (promoter) ในจีนของ TM ทำให้มีการสร้างลดลง^{7,8} ปริมาณที่ลดลงของ TM ส่งผลให้การทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของระบบการห้ามเลือด ต้านการอักเสบ และการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง จึงทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CAD มีรายงานความถี่ของโพลีมอร์ฟิซึมชนิดนี้ในชาวเอเชียร้อยละ 15-18⁷⁻¹¹ ซึ่งแตกต่างจากชาวตะวันตกที่พบได้น้อยกว่าร้อยละ 1¹² นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาที่ศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับการเกิด CAD^{7-11,13, 14} และยังมีผลที่สรุปได้ไม่ชัดเจน จึงได้มีการศึกษาโดยการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta analysis) ซึ่งสรุปว่าโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD 1.6 เท่า¹⁵ ดังนั้นโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA จึงอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อการเกิด CAD ในชาวเอเชีย

ปัจจุบัน CAD เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย มีอุบัติการณ์และอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น การศึกษาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจึงมีประโยชน์ในการช่วยวางแผนการรักษาและติดตามผลการรักษาของแพทย์ อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมชนิดนี้กับการเกิด CAD ในประชากรชาวไทย ดังนั้นจุดมุ่งหมายของการศึกษานี้จึงเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA กับ CAD

วิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

อาสาสมัครในการศึกษานี้ เป็นผู้ป่วยที่มีอาการเข้าข่าย CAD โดยยังไม่เคยมีกลุ่มอาการหลอดเลือดหัวใจตีบ

เฉียบพลัน (acute coronary syndrome) ซึ่งได้แก่ unstable angina และ myocardial infarction (MI) ซึ่งผู้ป่วยเข้ารับการตรวจรักษาที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 327 ราย ผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ผู้ชำนาญการโรคหัวใจ ยืนยันการวินิจฉัยด้วยผลการตรวจร่างกายและการตรวจพิเศษโดยการทำการ coronary angiography (CAG) ทั้งนี้ต้องไม่เป็นโรคอื่นหัวใจ โรคหัวใจวาย โรคตับ โรคไต โรคมะเร็งหรือภาวะอักเสบอื่นๆ ซึ่งจากผลการตรวจ CAG แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

กลุ่ม non-significant CAD หรือ non-CAD จำนวน 130 ราย คือกลุ่มที่มีร้อยละการตีบของหลอดเลือดหัวใจหลัก (left main coronary artery; LMCA, left anterior descending artery; LAD, left circumflex artery; LCX และ right coronary artery; RCA) น้อยกว่าร้อยละ 50

กลุ่ม CAD จำนวน 197 ราย คือกลุ่มที่มีร้อยละการตีบของหลอดเลือดหัวใจหลักอย่างน้อยหนึ่งเส้นมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50

เกณฑ์ในการจำแนกว่ามีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD มีดังนี้

โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) คือ มีความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (systolic blood pressure) มากกว่าหรือเท่ากับ 140 มิลลิเมตรปรอท หรือความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว (diastolic blood pressure) มากกว่าหรือเท่ากับ 90 มิลลิเมตรปรอท และ/หรือได้รับยาลดความดันโลหิต¹⁶

ภาวะอ้วน (obesity) คือมีค่าดัชนีมวลกาย (body mass index; BMI) มากกว่า 25 kg/m²¹⁷

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) คือ มีระดับ total cholesterol (TC) มากกว่าหรือเท่ากับ 240 mg/dL, triglyceride (TG) มากกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/dL, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) มากกว่า 160 mg/dL หรือ high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) น้อยกว่า 40 mg/dL และ/หรือได้รับยาลดระดับไขมันในเลือด¹⁸

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) คือ มีระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร (fasting blood sugar; FBS) มากกว่าหรือเท่ากับ 126 mg/dL หรือมีประวัติได้รับการรักษาโรคเบาหวาน¹⁹

การสูบบุหรี่ คือ มีประวัติของการสูบบุหรี่

ความรุนแรงของ CAD พิจารณาจากจำนวนเส้นของหลอดเลือดหัวใจหลักที่ตีบมากกว่าร้อยละ 50 และจากค่า Gensini score ซึ่งคำนวณจากร้อยละการตีบของหลอดเลือดและตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพ²⁰ ทั้งนี้จากค่า Gensini score ที่ได้ แบ่งระดับความรุนแรงเป็น 3 ระดับจากค่าของ Gensini score ที่เทอร์ไทล์ (tertile) ที่ 1 (น้อยกว่า 1.0) เทอร์ไทล์ที่ 2 (1.0 – 31.9) และเทอร์ไทล์ที่ 3 (มากกว่าหรือเท่ากับ 32.0)

การศึกษานี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE510414 โดยศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระเกียรติวีระกุล ได้รับรางวัลเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการวิจัยจากคณะผู้วิจัยและลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ

2. การเจาะเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำของอาสาสมัครทั้งดอาหารและเครื่องดื่มมาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เตรียมซีรัมจากเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งเพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลขณะอดอาหารและระดับของไขมันในเลือด

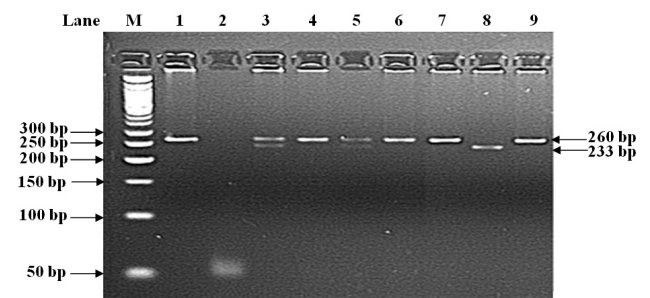
เตรียมดีเอ็นเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Flexi gene DNA kit (QIAGEN, Germany)

3. การตรวจหาจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA

ตรวจหาจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Zhao และคณะ⁹ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers คือ 5'-GGC CAG GGC TCG AGT TTA TAA AGG C-3' และ 5'-CGG GGA CAG TCG TCT GTT ACA G-3' (Pacific Science, Thailand) ตามลำดับส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวม 25 µL ประกอบด้วย forward และ reverse primers ความเข้มข้น 1 µM, dNTPs 0.2 mM, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil) 0.6 ยูนิต และตัวอย่างดีเอ็นเอ 100 ng ทำ PCR โดยใช้เครื่อง thermal cycler (PTC-100; MJ Research, Inc., USA และ G-storm, Gene Technology, UK) ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที และ PCR 32 รอบ โดยมี denaturation ที่ 94 °C 40 วินาที annealing ที่ 57 °C 30 วินาที

และ extension ที่ 72 °C 40 วินาที และ final extension ในขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 °C เป็นระยะเวลา 8 นาที โดยในแต่ละครั้งของการทำ PCR จะทำ no template control โดยการเติมน้ำแทนดีเอ็นเอในส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ผลผลิตที่ได้จาก PCR มีขนาด 260 bp ตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel (ISCBioExpress, USA) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ซึ่งมีส่วนผสมของ ethidium bromide (Promega, USA) ความเข้มข้น 0.4 µg/mL ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ที่ 100 mV เป็นเวลา 40 นาที และตรวจสอบผลที่ได้ด้วย UV transilluminator (Dolphin-DOC; Wealtec, USA) จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *StuI* (Fermentas Life Sciences, Germany) 2 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยวิธี gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose gel ร้อยละ 3.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เอนไซม์ *StuI* มีจุดตัดจำเพาะคือ 5' AGG*CCT 3' ซึ่งอัลลิล G มีผลผลิตที่ได้จาก PCR

ซึ่งไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ *StuI* จะไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *StuI* ทำให้ยังตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 260 bp ในขณะที่อัลลิล A มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ *StuI* ทำให้ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 233 และ 27 bp แต่เนื่องจากแถบดีเอ็นเอขนาด 27 bp ไม่ปรากฏบน agarose gel ดังนั้นจึงแยกจีโนไทป์ต่าง ๆ ออกจากกันโดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอขนาด 260 และ 233 bp คือ จีโนไทป์ GG พบดีเอ็นเอขนาด 260 bp จีโนไทป์ GA พบดีเอ็นเอขนาด 260 และ 233 bp และจีโนไทป์ AA พบดีเอ็นเอขนาด 233 bp (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 จีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA ที่ตรวจด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยย่อยด้วยเอนไซม์ *StuI* 2 ยูนิต/ปฏิกิริยา lane M = 50 bp ladder, lane 1 = undigested PCR product, lane 2 = no template control, lane 3, 5 = GA genotype, lane 4, 6, 7, 9 = GG genotype และ lane 8 = AA genotype

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17.0 โดยทดสอบการกระจายตัวของตัวแปรต่อเนื่องว่าเป็นแบบปกติหรือไม่ ด้วยสถิติ Kolmogorov-Smirnov test กรณีที่ไม่เป็นการกระจายตัวแบบปกติจะแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log10 ค่าพารามิเตอร์ชนิดตัวแปรต่อเนื่องที่มีการกระจายตัวแบบปกตินำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) กรณีที่ไม่เป็นการกระจายตัวปกตินำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ยเรขาคณิต \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (geometric mean \pm SD) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ student t-test สำหรับพารามิเตอร์เชิงกลุ่มนำเสนอในรูปแบบจำนวนและร้อยละ ทดสอบความแตกต่างด้วย Chi-square test โดยค่าสถิติต่าง ๆ มีระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร

ผลการศึกษา

ผลการเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานระหว่างกลุ่ม CAD และ non-CAD พบว่าอายุมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สัดส่วนของเพศชายในกลุ่ม CAD มากกว่ากลุ่ม non-CAD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สัดส่วนของภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ เบาหวาน และการสูบบุหรี่ของทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าความดันโลหิตในขณะหัวใจบีบตัวของทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ค่าความดันโลหิตในขณะหัวใจคลายตัวมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ TG, LDL-C, HDL-C และ FBS ของทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

Parameters	CAD (n = 197)	Non-CAD (n = 130)	p-value ^a
Age (years) ^b	62.0 \pm 8.8	60.6 \pm 8.8	0.180
Gender:			
Male, n (%)	137 (69.5)	54 (41.5)	< 0.001
Female, n (%)	60 (30.5)	76 (58.5)	
Hypertension, n (%)	167 (84.8)	88 (67.7)	< 0.001
Obesity, n (%)	89 (45.4)	57 (43.8)	0.781
Dyslipidemia, n (%)	190 (96.4)	111 (85.4)	< 0.001
DM, n (%)	74 (37.8)	29 (22.7)	0.004
Smoking, n (%)	76 (38.6)	28 (21.5)	0.001
SBP (mmHg) ^b	131.5 \pm 17.8	127.1 \pm 18.8	0.032
DBP (mmHg) ^b	74.2 \pm 11.0	72.9 \pm 9.6	0.279
BMI (kg/m ²) ^b	25.0 \pm 3.3	25.0 \pm 3.6	0.832
TC (mg/dL) ^b	179.9 \pm 51.3	171.5 \pm 42.1	0.182
TG (mg/dL) ^c	170.8 \pm 115.8	136.7 \pm 76.7	< 0.001
LDL-C (mg/dL) ^b	102.8 \pm 40.8	89.9 \pm 37.1	0.004
HDL-C (mg/dL) ^c	37.4 \pm 10.0	46.7 \pm 22.0	< 0.001
FBS (mg/dL) ^c	111.0 \pm 53.6	100.3 \pm 39.4	0.004
Gensini score ^c	30.2 \pm 32.2	0.0 \pm 1.2	< 0.001

DM: diabetes mellitus, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, BMI: body mass index, TC: total cholesterol, TG: triglyceride, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, FBS: fasting blood sugar, CAD: coronary artery disease

^a: เปรียบเทียบระหว่าง CAD และ non-CAD

^b: mean \pm SD

^c: geometric mean \pm SD

จากผลการตรวจพอลิมอร์ฟิซึม TM -33GA ในอาสาสมัครทั้งหมด 327 ราย พบว่าการกระจายตัวของความถี่จีโนไทป์เป็นไปตามกฎสมมูล Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนของแต่ละจีโนไทป์ของพอลิมอร์ฟิซึมในอาสาสมัครแต่ละกลุ่มแล้วเปรียบเทียบระหว่างผู้ที่มีและไม่มี

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ซึ่งได้แก่ ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดผิดปกติ เบาหวาน อ้วน และการสูบบุหรี่ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) รวมทั้งยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ที่มีจำนวนหลอดเลือดที่ตีบต่างกัน หรือมี Gensini score ที่แตกต่างกัน ก็มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 2 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของพอลิมอร์ฟิซึม TM -33GA

Group	Genotype frequencies			Allele frequencies		
	GG n (%)	GA+AA n (%)	p-value*	G allele 2 n (%)	A allele 2 n (%)	p-value*
CAD (n = 197)	181 (91.9)	16 (8.1)	0.913	377 (95.7)	17 (4.3)	0.855
Non-CAD (n = 130)	119 (91.5)	11 (8.5)		248 (95.4)	12 (4.6)	

CAD: coronary artery disease

*: เปรียบเทียบระหว่าง CAD กับ non-CAD โดยสถิติ Chi-square

ตารางที่ 3 ความถี่จีโนไทป์ของพอลิมอร์ฟิซึม TM -33GA ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่มที่มีและไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD

CAD risk factors	Genotype frequencies, n (%)					
	CAD			Non-CAD		
	GG	GA+AA	p-value	GG	GA+AA	p-value
Hypertension	154 (92.2)	13 (7.8)	0.683	82 (93.2)	6 (6.8)	0.330
Non-hypertension	27 (90.0)	3 (10.0)		37 (88.1)	5 (11.9)	
Dyslipidemia	175 (92.1)	15 (7.9)	0.543	102 (91.9)	9 (8.1)	0.726
Normolipidemia	6 (85.7)	1 (14.3)		17 (89.5)	2 (10.5)	
DM	68 (91.9)	6 (8.1)	0.852	27 (93.1)	2 (6.9)	0.711
Non-DM	113 (92.6)	9 (7.4)		90 (90.9)	9 (9.1)	
Smoking	71 (93.4)	5 (6.6)	0.530	26 (92.9)	2 (7.1)	0.777
Non-smoking	110 (90.9)	11 (9.1)		93 (91.2)	9 (8.8)	
Obesity	82 (92.1)	7 (7.9)	0.884	50 (87.7)	7 (12.3)	0.167
Non-obesity	98 (91.6)	9 (8.4)		69 (94.5)	4 (5.5)	

CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus

ตารางที่ 4 ความถี่จีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA ในผู้ป่วยที่มีจำนวนหลอดเลือดที่ตีบแตกต่างกัน

Number of stenosed vessels (n = 327)	Genotype, n (%)		p-value*
	GG	GA+AA	
0 vessel (n = 130)	119 (91.5)	11 (8.5)	0.548
1 vessel (n = 60)	55 (91.7)	5 (8.3)	
2 vessels (n = 67)	63 (94.0)	4 (6.0)	
3 vessels (n = 56)	49 (87.5)	7 (12.5)	
4 vessels (n = 14)	14 (100.0)	0 (0)	

*: เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยสถิติ Chi-square

ตารางที่ 5 ความถี่จีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตาม Gensini score

Gensini score (n = 327)	Genotypes, n (%)		p-value*
	GG	GA+AA	
< 1.0 (n = 111)	102 (91.9)	9 (8.1)	0.945
1.0-31.9 (n = 104)	96 (92.3)	8 (7.7)	
≥ 32.0 (n = 112)	102 (91.1)	10 (8.9)	

*: เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยสถิติ Chi-square

วิจารณ์

มีรายงานการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมกับจีน TM ได้แก่ -33GA, Ala455Val และ Ala25Thr และมีการศึกษาจำนวนมากที่ศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมเหล่านี้กับความเสี่ยงต่อการเกิด CAD ซึ่งผลการศึกษายังมีความหลากหลายและยังสรุปได้อย่างไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขนาดของกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ค่อนข้างน้อย จึงมีการศึกษาโดยการวิเคราะห์หกอภิมาน ซึ่งสรุปว่าโพลีมอร์ฟิซึมที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อ CAD ได้แก่ Ala455Val และ TM -33GA โดย Ala455Val อาจสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อ CAD ในชาวคอเคเซียน (Caucasian) ในขณะที่ -33GA มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CAD ในชาวเอเชีย โดยทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD 1.6 เท่า¹² ซึ่งมีรายงานว่า TM -33A อัลลีลมีความสามารถในการถอดรหัส (transcription activity) ในส่วนโปรโมเตอร์ของจีนต่ำกว่าอัลลีล TM -33G อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้มีการแสดงออกของ TM บนผิวของเซลล์ลดลง^{7,8} ซึ่ง TM นอกจากจะมีผลยับยั้งการสร้างลิ้มเลือดแล้วยังยับยั้งการอักเสบรวมทั้งยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์

ดังนั้นการแสดงออกของ TM บนผิวเซลล์ที่ลดลงจึงอาจส่งผลให้มีการสร้างลิ้มเลือดมากผิดปกติ และสามารถนำไปสู่ภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ้มเลือด⁶ จนทำให้เกิด MI ได้ นอกจากนี้ยังมีผลให้มีการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์กับเซลล์เอนโดทีเลียลเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งยังทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (vascular smooth muscle cell) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งเสริมให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งและเสี่ยงต่อ CAD สูงขึ้น⁴

การศึกษาในชาวเอเชียที่รายงานความสัมพันธ์ระหว่าง TM -33GA กับความเสี่ยงต่อการเกิด CAD ได้แก่การศึกษาในชาวเกาหลี⁷ ไต้หวัน^{10,11} จีน⁹ และอินเดีย¹³ จะเห็นได้ว่ายังมีการศึกษาในเชื้อชาติต่างๆ ไม่มากนัก และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลความสัมพันธ์ดังกล่าวในเชื้อชาติอื่นๆ การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA กับการเกิด CAD ในประชากรชาวไทย พบว่าความถี่จีโนไทป์ GA+AA ที่พบในคนไทยที่เป็น CAD ค่อนข้างต่ำ (ร้อยละ 8.1) เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในผู้ป่วย CAD ชาวเกาหลี (ร้อยละ 27.9)⁷ ผู้ป่วย CAD และ

ผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (acute myocardial infarction; AMI) ชาวไต้หวัน (ร้อยละ 23.8 และ 26 ตามลำดับ)^{10,11} และผู้ป่วย CAD ชาวจีน (ร้อยละ 20.3)⁹ แต่มีความถี่จีโนไทป์สูงกว่าที่พบในผู้ป่วย AMI ชาวอินเดียทางตอนเหนือ (ร้อยละ 2.5)¹³ ความแตกต่างของจีโนไทป์ระหว่างการศึกษานี้กับการศึกษาอื่นๆ อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของเชื้อชาติรวมถึงกลุ่มอายุของกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าพบจีโนไทป์ TM -33GA+AA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยได้สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุมาก^{7,9} ซึ่งกลุ่มผู้ป่วยในการศึกษานี้มีอายุเฉลี่ย 62 ปี ในขณะที่การศึกษาอื่นที่กล่าวมาส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในช่วงน้อยกว่า 45-55 ปี นอกจากนี้การศึกษานี้ยังไม่พบความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM -33GA กับ CAD ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ต่อการเกิด CAD รวมทั้งความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดหัวใจที่พิจารณาจากจำนวนหลอดเลือดหัวใจหลักที่มีการตีบ มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 หรือค่าของ Gensini score ซึ่งขัดแย้งกับกับผลการศึกษาของ Park และคณะ⁷ Li และคณะ¹⁰ รวมทั้ง Chao และคณะ¹¹ โดย Park และคณะ⁷ ซึ่งศึกษาในชาวเกาหลีพบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ GA+AA และมีหลอดเลือดหัวใจหลักตีบ 1 เส้น เสี่ยงต่อการเกิด MI 4.6 เท่า [Odds ratio (OR) =4.6] Li และคณะ¹⁰ ศึกษาในชาวไต้หวันพบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ GA+AA เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CAD 1.8 เท่า (OR = 1.8) และเสี่ยงต่อการเกิด MI 1.6 เท่า (OR=1.6) แต่อย่างไรก็ตาม Zhao และคณะ⁹ ซึ่งศึกษาในชาวจีนฮั่น และ Dogra และคณะ¹³ ศึกษาในชาวอินเดียทางตอนเหนือ รวมทั้งการศึกษาในชาวญี่ปุ่น ซึ่งมีขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ค่อนข้างใหญ่ (MI 445 ราย และกลุ่มควบคุม 464 ราย) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม TM -33 GA กับ CAD หรือ MI²¹ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในการศึกษานี้ ปัจจัยที่อาจเป็นสาเหตุทำให้มีความไม่สอดคล้องของผลการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับ CAD ในชาวเอเชียที่พบความถี่จีโนไทป์ GA+AA ได้สูงกว่าชาวคอเคเซียมนั้น อาจได้แก่ ขนาดของกลุ่มตัวอย่างและเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่มีความหลากหลาย ซึ่งประกอบด้วย 1) อายุ เนื่องจากมีรายงานว่า TM -33 GA+AA พบได้ในมากกว่าในผู้ที่มีอายุน้อย 2) ความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดหัวใจ มีทั้งที่ใช้เกณฑ์การตีบตั้งแต้อ้อยละ 70 และ 50 ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เกณฑ์มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 และ 3) กลุ่มควบคุมมีทั้งที่เป็นผู้ที่มีสุขภาพ

ปกติ ไม่มีอาการของ CAD และผู้ที่มีอาการของ CAD แต่ไม่มีการตีบของหลอดเลือดหัวใจตั้งแต่อ้อยละ 50 หรือ 70

สรุป

ในการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม TM -33 GA กับ CAD ในคนไทย ซึ่งมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่มีอาการเข้าข่ายของ CAD แต่ไม่พบการตีบของหลอดเลือดหัวใจหลักมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 รวมทั้งขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ยังมีจำนวนไม่มากนักจึงควรมีการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้นรวมทั้งควรมีการศึกษาในกลุ่มควบคุมที่เป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและไม่มีอาการเข้าข่าย CAD

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนค่าธรรมเนียมการศึกษาสำหรับนางนุชนาฏ สิทธิเดชผจญ จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Cardiovascular diseases (CVDs). WHO [online] [cited 30 January 2015]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
2. Public Health Statistics 2015. MOPH [online] [cited 30 January 2015]. Available from: <http://bps.moph.go.th/sites/default/files/saaehtusamkhay.pdf>.
3. Lippi G, Franchini M, Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 502-12.
4. Davis NE. Atherosclerosis an inflammatory process. *J Insur Med* 2005; 37: 72-5.
5. Ajjan RA, Ariens RA. Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state. *Blood Rev* 2009; 23: 67-78.
6. Conway EM. Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 107-25.
7. Park HY, Nabika T, Jang Y, Kwon HM, Cho SY, Masuda J. Association of G-33A polymorphism in the thrombomodulin gene with myocardial infarction in Koreans. *Hypertens Res* 2002; 25: 389-94.
8. Nakazawa F, Koyama T, Shibamiya A, Hirotsawa S. Characterization of thrombomodulin gene mutation of the 5'-regulatory region. *Atherosclerosis* 2002; 164: 385-7.

9. Zhao J, Zhou X, Huang J, Chen J, Gu D. Association study of the thrombomodulin -33G>A polymorphism with coronary artery disease and myocardial infarction in Chinese Han population. *Int J Cardiol* 2005; 100: 383-8.
10. Li YH, Chen JH, Wu HL, Shi GY, Huang HC, Chao TH, et al. G-33A mutation in the promoter region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. *Am J Cardiol* 2000; 85: 8-12.
11. Chao TH, Li YH, Chen JH, Wu HL, Shi GY, Tsai WC, et al. Relation of thrombomodulin gene polymorphisms to acute myocardial infarction in patients <or =50 years of age. *Am J Cardiol* 2004; 93: 204-7.
12. Le Flem L, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M, et al. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1098-104.
13. Dogra R, Das R, Ahluwalia J, Kumar RM, Talwar KK. Association of thrombomodulin gene polymorphisms and plasma thrombomodulin levels with acute myocardial infarction in north Indian patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013; 19: 637-43.
14. Li YH, Chen JH, Tsai WC, Chao TH, Guo HR, Tsai LM, et al. Synergistic effect of thrombomodulin promoter -33G/A polymorphism and smoking on the onset of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2002; 87: 86-91.
15. Zhang S, Zhang Z, Zhang F, Wei C, Bu Y, Zheng S, et al. Association between thrombomodulin polymorphisms and coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit* 2014; 20: 1407-12.
16. Afridi I, Canny J, Yao CH, Christensen B, Cooper RS, Kadiri S, et al. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertension* 2003; 21: 1983-92.
17. WHO. The Asia Pacific perspective: Refining obesity and its treatment. Sydney: Health Communications Australia Pty Limited; 2000.
18. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
19. WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: The WHO Document Production Services; 2006.
20. Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 1983; 51: 606.
21. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the Risk of Myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002; 347: 1916-23.