

ความชุกของโพลีมอร์ฟิซึมของไกลโคโปรตีน IIIa Leu33Pro บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดในผู้ที่มีไขมันในเลือดปกติและผิดปกติ ณ นครเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

Amphay Phyaluanglath¹ นันทรัตน์ โหมมานะสิน^{2*} ชาทรี เศรษฐเสถียร³ นงนุช เศรษฐเสถียร²
ไพศาล มงคลวงศ์โรจน์² Khamthavy Frichitthavong⁴

บทคัดย่อ

เกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงอุดตันจากลิ่มเลือด โดยไกลโคโปรตีนทำหน้าที่เป็นตัวรับที่สำคัญบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดในปฏิกิริยาการกระตุ้นเกล็ดเลือด ในปัจจุบันมีรายงานการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมจำนวนมากของไกลโคโปรตีนบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด ซึ่งไกลโคโปรตีนที่พบว่ามีมากที่สุด ได้แก่ ไกลโคโปรตีน IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ที่ประกอบด้วยยูนิตย่อย 2 ยูนิต คือ GPIIb และ GPIIIa และมีรายงานว่าโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro มีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจในชนชาติต่างๆ ทั้งในชาวตะวันตกและเอเชีย แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโพลีมอร์ฟิซึมนี้ในประชากรลาว ในขณะที่โรคหลอดเลือดหัวใจในประชากรลาวมีอุบัติการณ์สูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาความชุกของโพลีมอร์ฟิซึมในประชากรกลุ่มนี้ จึงน่าจะมีประโยชน์ในการประเมินความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมกับโรคหลอดเลือดหัวใจต่อไป จึงได้ทำการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมนี้ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในประชากรลาวที่ไม่มีประวัติและอาการของภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือดและภาวะเลือดออกผิดปกติจำนวน 200 ราย ที่มารับบริการตรวจสุขภาพประจำปีที่โรงพยาบาลมะโฮะสด นครเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 100 ราย ได้แก่ กลุ่มที่ระดับไขมันในเลือดปกติและกลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดผิดปกติ ผลการศึกษาพบว่า ความถี่จีโนไทป์ของ Leu/Leu และ Leu/Pro ในกลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดปกติและผิดปกติเท่ากับ 96.0 & 99.0 % และ 4.0 & 1.0 % ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังไม่พบจีโนไทป์ Pro/Pro ในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม สำหรับความถี่อัลลีล Leu และ Pro ในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 0.98 & 0.99 และ 0.02 & 0.01 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความชุกของโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro ในประชากรลาวต่ำกว่าชาวตะวันตกแต่ใกล้เคียงกับภูมิภาคอื่นๆ ในเอเชีย

คำสำคัญ: เกล็ดเลือด ไกลโคโปรตีน โพลีมอร์ฟิซึม สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

¹ นักศึกษามัธยมศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

² สายวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมะโฮะสด นครเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Prevalence of polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa Leu33 Pro in normolipemia and dyslipidemia in Vientiane Lao People's Democratic Republic

Amphay Phyaluenglath¹, Nantarat Komanasin^{2*}, Chattri Settasatian³, Nongnuch Settasatian², Paisal Mongkolwongroj², Khamthavy Frichitthavong⁴

ABSTRACT

Platelets play a critical role in atherothrombosis and platelet membrane glycoproteins are essential for the activation processes. A numbers of genetic polymorphisms of platelet membrane glycoproteins have been identified and some of them may predispose to thromboembolic events. Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) is the most abundant platelet receptors consisting of 2 subunits, GPIIb and GPIIIa. The GPIIIa Leu33Pro polymorphism has previously been reported to be associated with coronary artery disease (CAD) in several racial groups but has not been studied in Laos. Since CAD is becoming one of the high priority health problems in Lao People's Democratic Republic (PDR), study of the prevalence of the GPIIIa Leu33Pro polymorphism may provide the fundamental information for future evaluation of the association with the risk of CAD in this population. Two hundred unrelated subjects attended to Mahosod hospital, Vientiane, Lao PDR, for health check-up were recruited in this study, and divided into 2 groups composed of 100 individuals in each group with normal and abnormal serum lipids. All subjects had no history and clinical signs of arterial or venous thrombosis as well as a bleeding tendency. The GPIIIa Leu33Pro polymorphism was determined in genomic DNA extracted from leukocytes, using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The results demonstrated genotype frequencies of Leu/Leu and Leu/Pro in normolipidemia and dyslipidemia were 96.0 & 99.0 % and 4.0 & 1.0 %, respectively, whilst the respective allele frequencies of Leu and Pro were 0.98 & 0.99 and 0.02 & 0.01. There were no significant differences of the genotype and allele frequencies between both groups ($p > 0.05$). The homozygous Pro/Pro was not found in both groups. This is the first report of the genotype distribution of the GPIIIa Leu33Pro polymorphism in Lao PDR which showed similar prevalence as in Asians but lower than those in Caucasian populations.

Keywords: Platelet, Glycoprotein, Polymorphism, Lao PDR

¹ Postgraduate student in Medical Science, ² Faculty of Associated Medical Sciences,

³ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University,

⁴ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Mahosod Hospital, Vientiane, Lao People's Democratic Republic

* Corresponding author

บทนำ

เกล็ดเลือดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการห้ามเลือด โดยเฉพาะการห้ามเลือดปฐมภูมิ (primary hemostasis) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิ่มเกล็ดเลือด (platelet plug) ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาการเกาะติด (adhesion) การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเกาะกลุ่ม (aggregation) และการหลั่งสาร (secretion) นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดภาวะผนังหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) รวมทั้งการพัฒนาเป็นภาวะหลอดเลือดแดงอุดตันจากลิ่มเลือด (atherothrombosis) ซึ่งไกลโคโปรตีนที่จับอยู่กับเมมเบรนของเกล็ดเลือด (platelet membrane glycoproteins) มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเกล็ดเลือด โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ต่อสารตัวกระตุ้นรวมทั้งสารต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลเกาะติด (adhesion molecules)⁽¹⁾ กล่าวคือเมื่อหลอดเลือดมีการฉีกขาด เกล็ดเลือดจะเกาะติดกับผนังของหลอดเลือดที่มีการฉีกขาดโดยในระยะแรกไกลโคโปรตีน Ib/IX/V (GPIb/IX/V) จับกับ von Willebrand factor (vWF) ที่ยึดติดอยู่กับผนังของหลอดเลือด⁽²⁾ นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังจับกับคอลลาเจนในชั้นใต้เอนโดทีเลียม (subendothelial layer) โดยตรงโดยมีไกลโคโปรตีน Ia/IIa (GPIa/IIa) เป็นตัวรับเพื่อทำให้เกาะติดได้แน่นขึ้น⁽³⁾ เมื่อเกิดการเกาะติดจะมีการส่งสัญญาณผ่านเมมเบรนของเกล็ดเลือดทำให้มีการกระตุ้นปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเกล็ดเลือด รวมทั้งการดัดแปลงโมเลกุลของไกลโคโปรตีน IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ทำให้สามารถจับกับไฟบริโนเจนและเกิดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดขึ้นกลายเป็นลิ่มเกล็ดเลือด^(4, 5) จากบทบาทที่สำคัญของไกลโคโปรตีนบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดที่กล่าวมาแล้วในกระบวนการห้ามเลือดรวมทั้งการก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด (thrombosis) การเปลี่ยนแปลงของยีน (gene) ที่ควบคุมการแสดงออกของไกลโคโปรตีนเหล่านี้ อาจจะมีผลทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery diseases) ดังนั้นการตรวจหาโพลี

มอร์ฟิซึม (polymorphism) ของยีนดังกล่าวที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจรวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาด้วยยาต้านเกล็ดเลือด

มีรายงานเกี่ยวกับโพลีมอร์ฟิซึมของไกลโคโปรตีนบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีทั้งโพลีมอร์ฟิซึมที่มีความสัมพันธ์กับภาวะเลือดออกผิดปกติและภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด GPIIb/IIIa หรือ $\alpha_{IIb}\beta_3$ เป็นไกลโคโปรตีนที่พบเป็นจำนวนมากที่สุดบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด โดยพบประมาณ 80,000 ชุดต่อเกล็ดเลือด 1 ตัว⁽⁶⁾ ประกอบด้วย 2 ยูนิตย่อย (subunits) ได้แก่ GPIIb (α_{IIb}) และ GPIIIa (β_3) ทำหน้าที่เป็นตัวรับของไฟบริโนเจนและ vWF ซึ่งทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของไกลโคโปรตีนทั้ง 2 ยูนิตย่อยนี้อยู่บนโครโมโซม 17q21⁽⁷⁾ ซึ่งมีรายงานการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมหลายแบบบนยีนนี้ โดยโพลีมอร์ฟิซึมที่พบได้บ่อยในชาวตะวันตกและมีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ GPIIIa Leu33Pro (PI^{A1}/PI^{A2}) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ตำแหน่งที่ 1565 ใน exon ที่ 2 ของยีน GPIIIa แล้วทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 33 เปลี่ยนจาก leucine (Leu) เป็น proline (Pro) ซึ่งประกอบด้วยอัลลีล (allele) 2 ชนิด ได้แก่ Leu33 (PI^{A1} หรือ HPA-1a) และ Pro33 (PI^{A2} หรือ HPA-1b)⁽⁸⁾ โดยโพลีมอร์ฟิซึมนี้ทำให้เกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มมากกว่าปกติ⁽⁹⁾ นอกจากนี้ยังทำให้เกล็ดเลือดมีจุดจับกับไฟบริโนเจนเพิ่มขึ้น รวมทั้งถูกกระตุ้นได้ง่ายด้วยตัวกระตุ้นที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าปกติ⁽¹⁰⁾ และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือดในโรคหลอดเลือดหัวใจ⁽¹¹⁻¹³⁾ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 55 ปี⁽¹⁴⁾

โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นโรคที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตและพิการที่สำคัญในประเทศตะวันตก ในปัจจุบันอัตราการป่วยเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจพบมากขึ้นในประชากรของประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากความเจริญ

ก้าวหน้าทางเศรษฐกิจ ความคล่องตัวในการติดต่อถึงกันในโลกยุคไร้พรมแดน ทำให้วิถีการดำรงชีวิตมีการเปลี่ยนแปลงไปคล้ายคลึงกับความเป็นอยู่ของชาวตะวันตก สำหรับประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป.ลาว) จากข้อมูลของโรงพยาบาลมะโฮสัด นครเวียงจันทน์ พบว่าสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardio-vascular diseases) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลได้แก่ ภาวะสมองขาดเลือด (stroke) หัวใจวาย (heart failure) และกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (acute myocardial infarction)⁽¹⁵⁾ และจำนวนผู้ป่วยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากข้อมูลสถิติปี พ.ศ. 2548 ของโรงพยาบาลมะโฮสัดพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจำนวน 847 ราย โดยหนึ่งในสามของผู้ป่วยเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดประมาณ 300 ราย ที่เข้าพักรักษาในหออผู้ป่วยหนัก แผนกฉุกเฉิน⁽¹⁷⁾ จะเห็นได้ว่าโรคหลอดเลือดหัวใจได้กลายเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญปัญหาหนึ่งของสปป.ลาว ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro ในประชากรลาว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับโรคหลอดเลือดหัวใจในประชากรลาวต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง กลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษานี้เป็นประชาชนชาวลาวที่ไม่มีประวัติและอาการของภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ้มเลือดหรือภาวะเลือดออกผิดปกติที่มาใช้บริการตรวจสุขภาพประจำปีที่โรงพยาบาลมะโฮสัด นครเวียงจันทน์ สปป. ลาว จำนวน 200 ราย เป็นเพศชาย 79 ราย เพศหญิง 121 ราย มีอายุเฉลี่ย 39.3 ปี (22 - 61 ปี) โดยแบ่งอาสาสมัครเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดชนิดต่างๆ ปกติ ได้แก่ คอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol; TC) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride; TG) high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) และ low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) จำนวน 100 ราย และกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับของไขมันในเลือดชนิดใดชนิดหนึ่งผิดปกติจำนวน 100 ราย ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดผิดปกติได้แก่ มีระดับไขมันชนิด TC $\geq$ 240 mg/dL, TG $\geq$ 200 mg/dL, LDL-C $>$ 160 mg/dL หรือ HDL-C $<$ 35 mg/dL⁽¹⁸⁾ โดยอาสาสมัครทุกรายมีระดับของน้ำตาลในเลือด (fasting blood sugar; FBS) เอนไซม์ตับ (alanine aminotransferase; ALT) และครีเอทีนีน (creatinine) ปกติ ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ ของอาสาสมัครได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Characteristics of normolipidemic and dyslipidemic subjects

Variables	Normolipidemia (n = 100)	Dyslipidemia (n = 100)	p-value
Gender: Female (%)	48	73	< 0.001
Male (%)	52	27	
Age (years)	38.87 ± 8.47	40.65 ± 8.70	< 0.001
BMI (kg/m ²)	22.69 ± 4.00	23.90 ± 8.47	0.013
SBP (mm Hg)	106.50 ± 9.25	112.69 ± 9.22	< 0.001
DBP (mm Hg)	68.40 ± 8.01	73.66 ± 7.63	< 0.001
FBS (mg/dl)	94.76 ± 11.42	87.92 ± 812.78	< 0.001
Creatinine (mg/dl)	0.69 ± 0.10	0.71 ± 0.16	0.361
ALT (mg/dl)	30.03 ± 6.80	27.96 ± 7.28	0.037
TC (mg/dl)	184.38 ± 26.36	192.31 ± 53.96	0.109
TG (mg/dl)	113.84 ± 44.20	201.86 ± 88.34	< 0.001
HDL-C (mg/dl)	50.33 ± 9.58	43.89 ± 17.39	0.003
LDL-C (mg/dl)	111.54 ± 22.52	107.92 ± 44.06	0.479
TC/HDL-C	3.73 ± 0.58	4.66 ± 1.08	0.001
LDL-C/HDL-C	2.27 ± 0.53	2.65 ± 1.01	< 0.001

Values are mean ± SD or frequencies which are presented as percentage.

Group means of continuous variables were compared by independent t-test.

Chi-square analysis compared the frequency distribution of categorical variables.

BMI denotes body mass index, FBS: fasting blood sugar, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, ALT: alanine aminotransferase, TC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol

อาสาสมัครทุกรายที่เข้าร่วมงานวิจัยนี้ได้กรอกหนังสือยินยอมให้ทำการวิจัย และงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่นและกระทรวงสาธารณสุข สปป.ลาว

การเจาะเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด อาสาสมัครทุกรายจะต้องอดอาหารก่อนการเจาะเลือดอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เลือดสำหรับการตรวจปริมาณ FBS ใช้โซเดียมฟลูออไรด์เป็นสารกันเลือดแข็ง สำหรับเลือดที่ใช้สำหรับตรวจวัดระดับเอนไซม์ ALT ครีเอทีนีน และไขมัน

มันในเลือดเป็นเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งแล้วเตรียมเป็นซีรัม ส่วนเลือดที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวโดยใช้ชุดน้ำยาลำเร็จ FlexiGene DNA kit (QIAGEN, Germany) ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกปรับให้มีความเข้มข้น 100 ng/μL

การตรวจหาระดับสารเคมีในเลือด ตรวจวัดปริมาณ FBS ครีเอทีนีน และ ALT โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Cline analyzer 150 Lize; Bio Merieux, France) ตรวจวัด TC, TG, และ HDL-C ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Beckman CX4, USA) โดยใช้น้ำยาลำเร็จรูป (Trace; U.S Summit, Australia) ส่วน LDL-C ได้จากการคำนวณจากสูตรของ Friedewald⁽¹⁹⁾

การตรวจหาจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro ตรวจหาจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro ด้วยเทคนิค PCR-RFLP⁽²⁰⁾ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers (Quigen, Germany) คือ 5'-CTG CAG GAG GTA GAG AGT CGC CAT AG-3' และ 5'-GTG CAA TCC TCT GGG GAC TGA CTT G-3' ตามลำดับ ส่วนผสมต่างๆ ในปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 25 μL ประกอบด้วย forward และ reverse primers อย่างละ 0.1 μM dNTPs (Promega, USA) 200 μM, MgCl₂ (Promega, USA) 1.5 mM, PCR buffer (Promega, USA) 1X, Taq DNA polymerase (Promega, USA) 0.6 ยูนิต และดีเอ็นเอ 100 ng โดยทำ PCR จำนวน 36 รอบโดยใช้เครื่อง Thermal Cycler (PTC 100 และ PTC 200, MJ research, USA) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 57 °C เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที จากนั้นย่อยผลผลิตจาก PCR ด้วยเอนไซม์ Nci I (New England BioLabs; USA) 2 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โดยการทำ

electrophoresis โดยใช้ agarose gel (Promega, USA) 2% ที่มี ethidium bromide 0.4 μg/mL ผสมอยู่ด้วย เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงที่แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ จากนั้นตรวจสอบผลที่ได้ด้วย UV transilluminator (Gel DOC 1000, BIO-RAD, USA) แล้วถ่ายภาพเพื่อทำการวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในงานวิจัยนี้วิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS version 10 ข้อมูลที่เป็นค่าตัวเลขต่อเนื่องที่มีการกระจายตัวเป็นแบบโค้งปกติ (normal distribution) ได้แก่ อายุ BMI, FBS, TC, LDL-C/HDL-C และ ALT วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดปกติและผิดปกติโดยใช้สถิติ independent t-test ในกรณีที่ข้อมูลมีการกระจายไม่เป็นโค้งปกติ ซึ่งได้แก่ ครีเอทีนีน HDL-C, LDL-C, TG, TC/HDL-C ความดันโลหิตในขณะหัวใจบีบตัว (systolic blood pressure; SBP) และความดันโลหิตในขณะหัวใจคลายตัว (diastolic blood pressure; DBP) จะเปลี่ยนข้อมูลให้มีค่าเป็น log₁₀ ก่อนที่จะวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้สถิติ independent t-test สำหรับความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์ระหว่างกลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดปกติและผิดปกติ วิเคราะห์โดยใช้สถิติ Chi-square ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีค่า p < 0.05

ผลการศึกษา

เมื่อเปรียบเทียบตัวแปรต่างๆ ที่เป็นคุณสมบัติทางคลินิกและผลการตรวจสารเคมีชนิดต่างๆ ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดปกติและผิดปกติ พบว่าอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดผิดปกติส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง ในขณะที่อาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดปกติส่วนใหญ่เป็นเพศชายและมีอายุน้อยกว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**ตารางที่ 1**) ความดันโลหิตในขณะหัวใจบีบตัว และความดันโลหิตในขณะหัวใจคลายตัวในกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดผิดปกติมีค่าสูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดปกติอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ FBS ในกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดผิดปกติมีค่าต่ำกว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับระดับไขมันแต่ละชนิดในเลือดพบว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันเลือดผิดปกติมี TG, TC/HDL-C และ LDL-C/HDL-C สูงกว่า แต่มี HDL-C ต่ำกว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันในเลือดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ TC และ LDL-C ระหว่างอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัย

สำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) และเมื่อพิจารณาถึงชนิดของไขมันที่สูงกว่าปกติในกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไขมันเลือดผิดปกติ พบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่มี TG สูงกว่าปกติอย่างเดียว (34 %) ลำดับถัดมาคือมี HDL-C ต่ำกว่าปกติอย่างเดียว (27 %) มี LDL-C สูงกว่าปกติอย่างเดียว (12 %) และมี TG สูงกว่าปกติร่วมกับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ (11 %) ในขณะที่มี TC สูงกว่าปกติอย่างเดียวในสัดส่วนที่ต่ำมาก (4%) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 Types of dyslipidemia in 100 dyslipidemic subjects

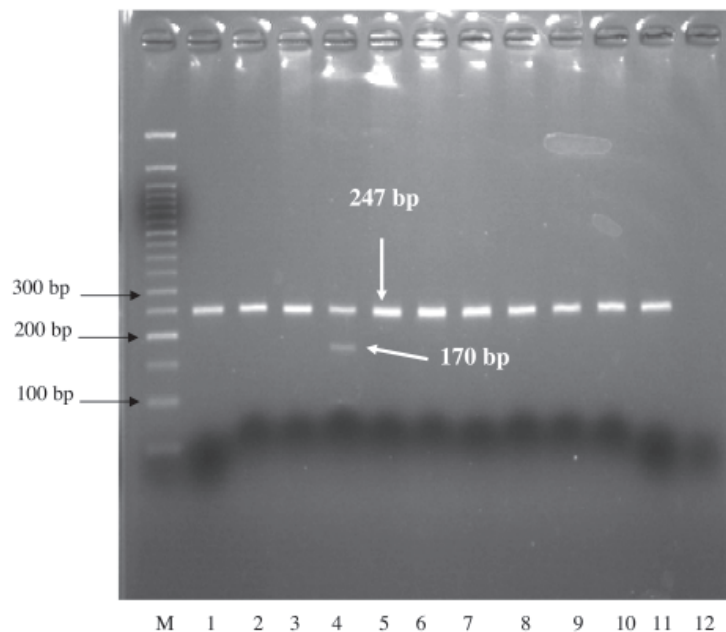
Types of dyslipidemia	Number of subjects
Hypercholesterolemia	4
Hypertriglyceridemia	34
Increased LDL-C	12
Decreased HDL-C	27
Hypercholesterolemia + hypertriglyceridemia	1
Hypercholesterolemia + increased LDL-C	3
Hypertriglyceridemia + increased LDL-C	3
Hypertriglyceridemia + decreased HDL-C	11
Hypercholesterolemia+ hypertriglyceridemia + increased LDL-C	4
Hypertriglyceridemia + increased LDL- C + decreased HDL-C	1

จากการตรวจหาจีโนไทป์ของ GPIIIa Leu33Pro จากดีเอ็นเอของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม โดยเทคนิค PCR-RFLP ผลผลิตจาก PCR มีขนาด 247 bp และหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ *NciI* อัลลิล (allele) Pro ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ *NciI* (CC'GGG) จะถูกย่อยได้เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 170 และ 77 bp ในขณะที่อัลลิล Leu ซึ่งไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ *NciI* จะไม่ถูกย่อย จึงตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 247 bp (รูปที่ 1) แต่

เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 77 bp บน agarose gel จึงแยกจีโนไทป์ต่างๆ ออกจากกันโดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอขนาด 247 bp และ 170 bp กล่าวคือจีโนไทป์ Leu/Leu พบแถบดีเอ็นเอขนาด 247 bp จีโนไทป์ Pro/Pro พบแถบดีเอ็นเอขนาด 170 bp และจีโนไทป์ Leu/Pro พบแถบดีเอ็นเอขนาด 247 และ 170 bp (รูปที่ 1) ซึ่งจากงานวิจัยนี้ไม่พบจีโนไทป์ Pro/Pro ในอาสาสมัครทั้งสองกลุ่ม ในขณะที่ความถี่จีโนไทป์ Leu/Leu และ Leu/Pro ในอาสาสมัครที่มีระดับไขมันใน

เลือดปกติและผิดปกติเท่ากับ 96.0 vs. 99.0 % และ 4.0 vs. 1.0 % ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งการกระจายความถี่จีโนไทป์ในทั้ง 2 กลุ่ม เป็นไปตาม Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) สำหรับความถี่อัลลีล Leu และ Pro ในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม

เท่ากับ 0.98 vs. 0.99 และ 0.02 vs. 0.01 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และเนื่องจากพบอัลลีล Pro ในประชากรลาวต่ำมากจึงไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro กับตัวแปรอื่นๆ ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้



รูปที่ 1 Analysis of GPIIIa Leu33Pro polymorphism by PCR-RFLP using 2 unit of *Nci* I endonuclease. 50 bp ladder was used as standard marker of DNA. (M : 50 bp ladder, lane 1 : undigested product, lane 2,3,5-11 : Leu/Leu, Lane 4 : Leu/Pro, lane 12: non-template control)

ตารางที่ 3 Genotype and allele frequencies of the GPIIIa Leu33Pro polymorphism in normolipidemic (NL) and dyslipidemic (DL) subjects

Subjects	Genotype frequencies (%)		% Difference (95% CI) ^a	Allele frequencies		p-value ^b
	Leu/Leu	Leu/Pro		Leu	Pro	
NL (n=100)	96.00	4.00	3 % (-1.3 to 7.3)	0.98	0.02	> 0.05
DL (n=100)	99.00	1.00		0.99	0.01	

^a The difference and 95% confidence interval (CI) in the percentage of Pro33 carriers calculated based on a binomial distribution.

^b Chi-square analysis was used to compare the distribution of genotypes between groups of subjects.

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

GPIIb/IIIa เป็นไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดที่มีเป็นจำนวนมากที่สุด⁽⁶⁾ และจีนที่ควบคุมการแสดงออกของไกลโคโปรตีนชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ได้ง่าย (highly polymorphic) โพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa Leu33Pro หรือ PI^{A1}/PI^{A2} เป็นหนึ่งในหลายโพลีมอร์ฟิซึมที่มีรายงานโดยอัลลิล Pro หรือ PI^{A2} มีความสัมพันธ์กับการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เกิดได้ง่ายขึ้น กล่าวคือ เอพิเนฟริน (epinephrine) ที่ใช้ในการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของอาสาสมัครที่มีอัลลิล Pro มีความเข้มข้นต่ำกว่าการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของอาสาสมัครที่มีจีโนไทป์ Leu/Leu หรือ PI^{A1}/PI^{A1} โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของไฟบริโนเจนที่สูงขึ้น^(9, 21) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของเกล็ดเลือดต่อตัวกระตุ้นที่พบในโพลีมอร์ฟิซึมนี้อาจทำให้มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและการดื้อต่อการรักษาด้วยยาแอสไพริน ดังนั้นการศึกษาความถี่จีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้จึงมีความสำคัญซึ่งมีรายงานความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้ในชนชาติต่างๆ โดยมีอุบัติการณ์ค่อนข้างสูงในชาวตะวันตกและต่ำในชาวเอเชีย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม GPIIIa ในประชากรลาวโดยแยกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีไขมันในเลือดปกติและกลุ่มที่มีไขมันในเลือดผิดปกติ ทั้งนี้เนื่องจากการมีไขมันในเลือดผิดปกติเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction)⁽¹³⁾ และมีรายงานว่าไขมันในเลือดที่สูงขึ้นจะทำให้เกล็ดเลือดเกาะตัวกันมากขึ้น⁽²²⁾ จากการศึกษาที่พบว่าความชุก (prevalence) ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้ในประชากรลาวในนครเวียงจันทน์ต่ำมาก กล่าวคือ จากอาสาสมัคร 200 ราย ไม่พบจีโนไทป์ Pro/Pro และพบจีโนไทป์ Leu/Pro เพียง 2.5% โดยมีความถี่อัลลิล Pro เท่ากับ 0.015 ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีไขมันในเลือดปกติและผิดปกติ ความชุกของโพลีมอร์ฟิซึมที่พบในประชากรลาวนี้คล้ายคลึงกับการที่มีรายงานในชาวเอเชียภูมิภาคอื่นๆ ได้แก่ ไทย อินโดนีเซีย มาเลเซีย เกาหลี ญี่ปุ่น จีน และได้หวัน⁽²³⁻²⁸⁾ ซึ่งมีความถี่อัลลิล Pro ในช่วง 0.002-0.030 (ตารางที่ 4) ในขณะที่ความชุกที่พบในชาวเอเชียใต้ซึ่งได้แก่ ชาวอินเดียในยุโรป และชาวอินเดียในประเทศสิงคโปร์ มีความถี่อัลลิล Pro ประมาณ 0.1 แต่ก็ยังต่ำกว่าความชุกที่พบในชาวตะวันตกซึ่งอยู่ในช่วง 0.13-0.16⁽²⁹⁻³²⁾

ตารางที่ 4 Pro allele frequencies of the GPIIa Leu33Pro polymorphism in different populations

Population	Number of subjects	Frequency of Pro allele	Reference
Laos	200	0.015	This study
Thais; north eastern of Thailand	300	0.03	23
Thais; Singapore	137	0.015	25
Indonesian	107	0.009	24
Malay; Singapore	193	0.01	25
Chinese; Singapore	316	0.03	25
Japanese	331	0.002	26
Korean	200	0.012	27
Taiwanese	295	0.002	24
Indian; Singapore	197	0.1	25
Indian; Western	506	0.0195	28
Austrian	900	0.15	31
Danish	1,191	0.16	13
Dutch	200	0.15	32
German	98	0.16	20
European	423	0.14	12
Polish	906	0.13	30

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความชุกของโพลีมอร์ฟิซึมในชาวลาอต่ำมากซึ่งมีความคล้ายคลึงกับความชุกที่พบในชาวเอเชียภูมิภาคอื่นๆ ยกเว้นชาวเอเชียใต้ที่มีความชุกใกล้เคียงกับที่พบในชาวตะวันตก

เอกสารอ้างอิง

1. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 2004; 114: 447-53.

2. Fredrickson BJ, Dong JF, McIntire LV, Lopez JA. Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 1998; 92: 3684-93.
3. Furihata K, Nugent DJ, Kunicki TJ. Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 305-9.
4. Shpilberg O, Rabi I, Schiller K, Walden R, Harats D, Tyrrell KS, et al. Patients with Glanzmann thrombasthenia lacking platelet glycoprotein alpha(IIb)beta(3) (GPIIb/IIIa) and alpha(v)beta(3) receptors are not protected from atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1044-8.
5. Colman RW, Bennett JS, Sheridan JF, Cooper RA, Shattil SJ. Halofenate: a potent inhibitor of normal and hypersensitive platelets. *J Lab Clin Med* 1976; 88: 282-91.
6. Nurden AT. Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. *Thromb Haemost* 1995; 74: 345-51.
7. Charakida M, Donald AE, Green H, Storry C, Clapson M, Caslake M, et al. Early structural and functional changes of the vasculature in HIV-infected children: impact of disease and antiretroviral therapy. *Circulation* 2005; 112: 103-9.
8. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83: 1778-81.
9. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Platelet glycoprotein IIIa PI(a) polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 104: 140-4.
10. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, et al. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101: 1013-8.
11. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-4.
12. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Association of the platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism with survival after acute ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30: 2606-11.
13. Grove EL, Orntoft TF, Lassen JF, Jensen HK, Kristensen SD. The platelet polymorphism PIA2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J Intern Med* 2004; 255: 637-44.
14. Zotz RB, Winkelmann BR, Muller C, Boehm BO, Marz W, Scharf RE. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1522-9.
15. Smolders RG, Vogelvang TE, Mijatovic V, van Baal WM, Neele SJ, Netelenbos JC, et al. A 2-year, randomized, comparative, placebo-controlled study on the effects of raloxifene on lipoprotein(a) and homocysteine. *Maturitas* 2002; 41: 105-14.
16. Lao Census. In: Center NS, editor.; 2005.
17. Evangelou AM. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994; 50: 1-28.
18. Grundy SM. National Cholesterol Education Program. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel II). *Circulation* 1994; 89: 1329-445.

19. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
20. Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(PIA), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol* 1995; 89: 169-76.
21. Woo KS, Chook P, Raitakari OT, McQuillan B, Feng JZ, Celermajer DS. Westernization of Chinese adults and increased subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2487-93.
22. Douglas H, Michaelides K, Gorog DA, Durante-Mangoni E, Ahmed N, Davies GJ, et al. Platelet membrane glycoprotein Iba1 gene -5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor for the occurrence of coronary thrombosis. *Heart* 2002; 87: 70-4.
23. Romphruk AV, Akahat J, Srivanichrak P, Puapairoj C, Romphruk A, Leelayuwat C. Genotyping of human platelet antigens in ethnic northeastern Thais by the polymerase chain reaction-sequence specific primer technique. *J Med Assoc Thai* 2000; 83: 1334-9.
24. Liu TC, Shih MC, Lin CL, Lin SF, Chen CM, Chang JG. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-8w platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, and Thai. *Ann Hematol* 2000; 81: 244-8.
25. Lim J, Lal S, Ng KC, Ng KS, Saha N, Heng CK. Variation of the platelet glycoprotein IIIa PI(A1/A2) allele frequencies in the three ethnic groups of Singapore. *Int J Cardiol* 2003; 90: 269-73.
26. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion* 1996; 36: 813-7.
27. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* 1998; 8: 129-32.
28. Kulkarni B, Mohanty D, Ghosh K, Pawar A, Khare A. Frequency distribution of antigens in the human platelet antigen-1 system in the western Indian population. *Transfusion* 2002; 42: 317-20.
29. Sperr WR, Huber K, Roden M, Janisiw M, Lang T, Graf S, et al. Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. *Thromb Res* 1998; 90: 117-23.
30. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the polish population. *Transfus Med* 1998; 8: 339-42.
31. Holensteiner A, Walchshofer S, Alder A, Kitl EM, Mayr WR, Panzer S. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis* 1995; 25: 133-6.
32. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81: 835-40.