

โพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 ระดับของ PAI-1 ในพลาสมา และปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูง ต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจชาวไทย

บุตมา รัตนวรรณ^{1,2}, บัณฑิตน์ โหมานะสิน^{2,3*}, บุญชู เศรษฐเสถียร^{2,4}, ชาตรี เศรษฐเสถียร^{2,5},
ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์^{2,6}, พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร^{2,7}, เกษม ต้นดีพาณิชธีระกุล^{2,7}, วิชัย แสนทอง^{2,7},
ไพศาล มงคลวงศ์โรจน์^{2,3}, ปิยทัศน์ กัศนาวิวัฒน์^{2,8}

Received: April 27, 2012

Revised & Accepted: May 24, 2012

บทคัดย่อ

การละลายลิ่มเลือดที่ช้ากว่าปกติเนื่องจากการมีระดับของตัวยับยั้งตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจนชนิดที่ 1 (plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) ที่สูงกว่าปกติเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด ซึ่งอาจทำให้การดำเนินของการเกิดหลอดเลือดอุดตันจาก atherosclerosis เกิดเร็วขึ้น และเนื่องจากมีรายงานวาระดับของ PAI-1 มีความสัมพันธ์กับโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 และยังมีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 และระดับของ PAI-1 ในพลาสมา กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD สูง โดยตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 ด้วยวิธี multiplex allele-specific polymerase chain reaction และตรวจวัดระดับของ PAI-1 ในพลาสมาด้วยวิธีอีไลซ่า ในอาสาสมัครที่มีอาการเข้าข่ายโรคหลอดเลือดหัวใจและเข้ารับการรักษาที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาควิชาโรคอกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 131 ราย ซึ่งอาสาสมัครทุกรายได้รับการตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ผู้ชำนาญการโรคหัวใจโดยการทำการ coronary angiography แล้วมีร้อยละการตีบของหลอดเลือดหัวใจหลักน้อยกว่าร้อยละ 50 ผลการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมในอาสาสมัครพบว่าความถี่ของจีโนไทป์ 4G/4G, 4G/5G และ 5G/5G เท่ากับร้อยละ 32.3, 50.4 และ 17.3 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของจีโนไทป์ต่าง ๆ โดยจำแนกตามปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ แต่พบว่าผู้ที่มียาลิล 4G (4G carrier) มีระดับของ total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) และ TC/high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) สูงกว่าผู้ที่เป็น homozygous 5G/5G อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับของไขมันในเลือดที่สูงขึ้นเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับระดับของ PAI-1 ที่สูงขึ้นด้วย สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมกับระดับของ PAI-1 นั้น พบว่าผู้ที่มียาลิล 4G/4G homozygous มีระดับของ PAI-1 สูงที่สุดแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($4G/4G = 10.1 \pm 7.9$ ng/mL, $4G/5G = 9.2 \pm 6.8$ ng/mL และ $5G/5G = 8.3 \pm 4.4$ ng/mL, $P = 0.752$) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 และระดับของ PAI-1 ในพลาสมาของผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด CAD แม้ว่าจะไม่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD หลาย ๆ ปัจจัย แต่อัลลีล 4G และระดับของ PAI-1 ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับไขมันในเลือดชนิด TC, TG และ LDL-C ที่สูงกว่าปกติ ซึ่งการพบความผิดปกติทั้ง 2 อย่างร่วมกันอาจทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CAD

คำสำคัญ: โรคหลอดเลือดหัวใจ, โพลีมอร์ฟิซึม, ตัวยับยั้งตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจนชนิดที่ 1

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ ² กลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด

³ กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก และ ⁴ กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ⁵ ภาควิชาพยาธิวิทยา และ

⁶ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ⁷ ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาควิชาโรคอกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁸ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น * ผู้รับผิดชอบบทความ

4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene, plasma PAI-1 level and cardiovascular risk factors in Thai patients with high risk for coronary artery disease

Chutima Rattanawan^{1,2}, Nantarat Komanasin^{2,3*}, Nongnuch Settasatian^{2,4}, Chatri Settasatian^{2,5},
Upa Kukongwiriyan^{2,6}, Pongsak Intharapetch^{2,7}, Kasem Tantipanichtheerakul^{2,7}, Vichai Senthong^{2,7},
Paisal Mongkolwongroj^{2,3}, Pyatat Tatsanavivat^{2,8}

Abstract

Impaired fibrinolysis due to elevated plasma plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) has been shown to be associated with an increased risk of thrombotic events and may also accelerate the atherosclerotic stenosis process. Since PAI-1 4G/5G polymorphism has been associated with PAI-1 level and the other conventional risk factors for coronary artery disease (CAD), we therefore investigated the associations of the polymorphism, PAI-1 antigen level and the other conventional risk factors for CAD in Thai patients with high risk for CAD. A total of 131 Thai patients who were clinically suspected of having CAD undergoing coronary angiography at the Cardiac Catheterization Unit at Queen Sirikit Heart Center of the Northeast Hospital, Khon Kaen University, showing less than 50 % stenosis of major coronary arteries were recruited in this study. The polymorphism was determined using multiplex allele-specific polymerase chain reaction whereas PAI-1 antigen level was measured by an ELISA technique. The traditional risk factors for CAD were also evaluated in the study population. The results showed that genotype frequencies of 4G/4G, 4G/5G and 5G/5G were 32.3, 50.4 and 17.3%, respectively. The association between genotype frequencies of the polymorphism and the traditional risk factors for CAD was not found. Interestingly, significantly higher levels of total cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein-cholesterol and TC/high density lipoprotein-cholesterol were observed in 4G allele carriers than in homozygous 5G/5G. In addition, those lipid parameters were correlated with plasma PAI-1 levels. The association of PAI-1 level with the polymorphism was investigated and found no significant difference in PAI-1 level among each genotype (4G/4G = 10.1 ± 7.9 ng/mL, 4G/5G = 9.2 ± 6.8 ng/mL and 5G/5G = 8.3 ± 4.4 ng/mL, $P = 0.752$). In conclusion, the results of this study showed the association of 4G allele and an elevated PAI-1 level with the increased levels of plasma lipid parameters which are risk factors for CAD. This may suggest that the interaction of these two parameters may increase risk of thrombotic events in Thai patients with high risk of CAD.

Keywords: Coronary artery disease, Polymorphism, PAI-1

¹ postgraduate student in Medical Science, Faculty of Associated Medical Sciences, ² Cardiovascular Research Group, ³ Department of Clinical Microscopy and ⁴ Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, ⁵ Department of Pathology and ⁶ Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, ⁷ Queen Sirikit Heart Center of the Northeast Hospital, Khon Kaen University, ⁸ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

* Corresponding author (e-mail: nankom@kku.ac.th)

บทนำ

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) เป็นโรคที่เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของประชากรทั่วโลก⁽¹⁾ และเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ในประเทศไทย⁽²⁾ สาเหตุของการเกิด CAD มีทั้งจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น เพศ อายุ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วน กลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndromes) และการสูบบุหรี่ หรือเกิดร่วมกับปัจจัยทางพันธุกรรมประกอบกัน^(3, 4) โดยปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ผนังหลอดเลือดทำให้มีการสะสมของไขมันและเซลล์อักเสบต่าง ๆ ในผนังหลอดเลือด

ตัวยับยั้งตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจนชนิดที่ 1 (plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) เป็นตัวยับยั้งกระบวนการละลายลิ่มเลือดที่สำคัญ โดยจับกับ tissue-type plasminogen activator (t-PA) และ urokinase-type plasminogen activator (u-PA) ในอัตราส่วน 1:1 ทำให้เกิดการยับยั้งการเปลี่ยนพลาสมิโนเจน (plasminogen) ไปเป็นพลาสมิน (plasmin) จึงสามารถยับยั้งการละลายลิ่มเลือดด้วยพลาสมินได้^(5, 6) หากระดับของ PAI-1 ในพลาสมาสูงกว่าปกติจะทำให้เกิดการละลายลิ่มเลือดที่ช้าหรือน้อยกว่าปกติ (hypofibrinolysis) ซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นจากการที่มีการฉีกขาดของผนังหลอดเลือดที่เกิด CAD อุดกั้นการไหลของเลือดได้นานขึ้นทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (acute myocardium infarction; AMI) ได้⁽⁷⁾

โพลีมอร์ฟิซึมในตำแหน่ง promoter ของจีน PAI-1 ที่ตำแหน่ง - 675 คือ single guanosine insertion/deletion (4G/5G) มีความสำคัญต่อระดับของ PAI-1 ในพลาสมา โดยมีการศึกษาพบว่าอัลลีล 4G จะมีการสร้าง PAI-1 สูงกว่าอัลลีล 5G เนื่องจากทั้ง transcription และ repressor factors จะจับกับอัลลีล 5G ในขณะที่เฉพาะ transcription factor เท่านั้นที่จับกับอัลลีล 4G จึงทำให้ผู้ที่มีอัลลีล 4G มีระดับของ PAI-1 สูงกว่าอัลลีล 5G^(8, 9) นอกจากนี้ยังพบว่าการมี PAI-1 ในพลาสมาสูงมีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่อ CAD⁽¹⁰⁻¹²⁾ ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วน กลุ่มอาการเมแทบอลิก และการสูบบุหรี่ ดังนั้นจีโนไทป์ 4G/4G หรือผู้ที่มีอัลลีล 4G (4G carrier) รวมทั้งระดับของ PAI-1 ในพลาสมาจึงอาจใช้ทำนายความเสี่ยงต่อการเกิด CAD ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษา

เกี่ยวกับโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 ใน CAD ยังขัดแย้งกันอยู่ โดย Onalan และคณะ⁽¹³⁾ พบว่าจีโนไทป์ 4G/4G เป็นปัจจัยในการป้องกันการเจริญของรอยโรค CAD ส่วน Rallidis และคณะ พบว่าผู้ที่มีอัลลีล 4G (4G carrier) นั้นลดความเสี่ยงของการเกิด AMI ได้⁽¹⁴⁾ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 ระดับของ PAI-1 ในพลาสมา กับปัจจัยเสี่ยงของการเกิด CAD ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีความเสี่ยงในการเกิด CAD สูง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและตรวจหาตัวบ่งชี้เพื่อช่วยในการประเมินความเสี่ยงและการเกิดภาวะแทรกซ้อนของผู้ป่วยในการดำเนินโรคไปเป็น CAD ต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

เป็นอาสาสมัครที่มีอาการเข้าข่ายโรคหลอดเลือดหัวใจและเข้ารับการรักษาศูนย์หัวใจศิริกิติ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 131 ราย ซึ่งอาสาสมัครทุกรายได้รับการตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ผู้ชำนาญการโรคหัวใจโดยการทำการ coronary angiography แล้วมีรอยละการตีบของหลอดเลือดหัวใจหลัก (left main coronary artery; LCA, left anterior descending; LAD, left circumflex artery; LCX และ right coronary artery; RCA) น้อยกว่าร้อยละ 50 นอกจากนี้อาสาสมัครทุกรายต้องไม่มีอาการของโรคหัวใจ โรคหัวใจวาย โรคไต โรคมะเร็ง หรือภาวะอักเสบอื่นๆ ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกผู้ป่วยว่ามีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD มีดังนี้

โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) คือ มีความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (systolic blood pressure) ≥ 140 mmHg หรือ ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว (diastolic blood pressure) ≥ 90 mmHg และ/ หรือได้รับยาลดความดันโลหิต⁽¹⁵⁾

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) คือ มีระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร (fasting blood sugar; FBS) >126 mg/dL หรือมีประวัติได้รับการรักษาโรคเบาหวาน⁽¹⁶⁾

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) คือ มีระดับ total cholesterol (TC) ≥ 240 mg/dL, triglyceride (TG) ≥ 200 mg/dL, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) > 150 mg/dL หรือ high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) < 35 mg/dL และ/หรือได้รับยาลดระดับไขมันในเลือด⁽¹⁷⁾

ภาวะอ้วน (obesity) คือ มีค่าดัชนีมวลกาย (body mass index; BMI) $> 25 \text{ kg/m}^2$ ⁽¹⁸⁾

กลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndrome) คือ ผู้ที่เข้าข่ายเกณฑ์ต่อไปนี้ 3 ข้อขึ้นไป 1) เส้นรอบเอว $\geq 90 \text{ cm}$ ในเพศชาย หรือ $\geq 80 \text{ cm}$ ในเพศหญิง 2) ระดับ TG $\geq 150 \text{ mg/dL}$ 3) ระดับ HDL-C $< 40 \text{ mg/dL}$ ในเพศชาย

หรือ $< 50 \text{ mg/dL}$ ในเพศหญิง หรือได้รับยาลดระดับไขมันในเลือด 4) ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว $\geq 130 \text{ mmHg}$ และ/หรือ ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว $\geq 85 \text{ mmHg}$ และ/หรือได้รับยาลดความดันโลหิต 5) ระดับ FBS $\geq 100 \text{ mg/dL}$ หรือได้รับยารักษาโรคเบาหวาน ⁽¹⁹⁾ ซึ่งได้สรุปข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครไว้ใน **ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD สูง

Variables	High risk CAD patients			P - value ^a
	All patients (n = 131)	Male (n = 57)	Female (n = 74)	
Age (years)	60.4 $\pm$ 9.0	59.7 $\pm$ 9.7	61.0 $\pm$ 8.4	0.414
BMI (kg/m ²)	24.8 $\pm$ 3.5	24.7 $\pm$ 3.6	24.8 $\pm$ 3.4	0.881
Waist circumference (cm)	89.7 $\pm$ 9.6	89.9 $\pm$ 8.2	89.6 $\pm$ 10.7	0.896
Waist/hip ratio	0.93 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.07	0.303
Smoking, n (%)	29 (22.5)	29 (50.9)	0 (0)	<0.001
Obesity, n (%)	54 (41.2)	24 (42.1)	30 (40.5)	0.857
Visceral obesity, n (%)	25 (32.5)	3 (5.3)	22 (29.7)	0.001
Dyslipidemia, n (%)	107 (81.7)	47 (82.5)	60 (81.1)	0.840
Diabetic mellitus, n (%)	27 (20.6)	10 (17.5)	17 (23.0)	0.446
Hypertension, n (%)	97 (74.0)	43 (75.4)	54 (73.0)	0.750
Metabolic syndromes, n (%)	105 (80.2)	45 (88.2)	60 (82.2)	0.358
Insulin resistance (IR), n (%)	102 (88.7)	43 (89.6)	53 (89.8)	0.967
FBS* (mg/dL)	100.6 $\pm$ 39.7	101.5 $\pm$ 22.9	100.0 $\pm$ 48.3	0.752
SBP (mm Hg)	127.4 $\pm$ 18.2	131.9 $\pm$ 19.0	123.9 $\pm$ 16.9	0.013
DBP (mm Hg)	73.1 $\pm$ 9.5	74.6 $\pm$ 9.4	71.9 $\pm$ 9.4	0.105
TG (mg/dL)	153.6 $\pm$ 78.8	170.7 $\pm$ 86.8	140.0 $\pm$ 69.6	0.027
TC (mg/dL)	169.2 $\pm$ 44.6	159.7 $\pm$ 41.9	176.7 $\pm$ 45.6	0.031
HDL-C (mg/dL)	45.9 $\pm$ 14.9	40.2 $\pm$ 13.4	50.4 $\pm$ 14.6	<0.001
LDL-C (mg/dL)	92.6 $\pm$ 35.5	81.6 $\pm$ 3.9	99.0 $\pm$ 37.7	0.021
TC/HDL-C	4.0 $\pm$ 1.4	4.3 $\pm$ 1.4	3.7 $\pm$ 1.4	0.030
HOMA-IR*	3.7 $\pm$ 2.7	3.8 $\pm$ 2.1	3.7 $\pm$ 3.1	0.784
PAI-1 antigen (ng/mL)	9.4 $\pm$ 6.8	9.4 $\pm$ 6.5	9.5 $\pm$ 7.1	0.958

ข้อมูลต่อเนื่องแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD ยกเว้นที่มีเครื่องหมาย * แสดงค่าเป็น geometric mean $\pm$ SD

^a: เปรียบเทียบระหว่างเพศชายและเพศหญิง

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE510414 โดยอาสาสมัคร

ทุกรายได้รับการชี้แจงเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการวิจัยจากคณะผู้วิจัยและลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ

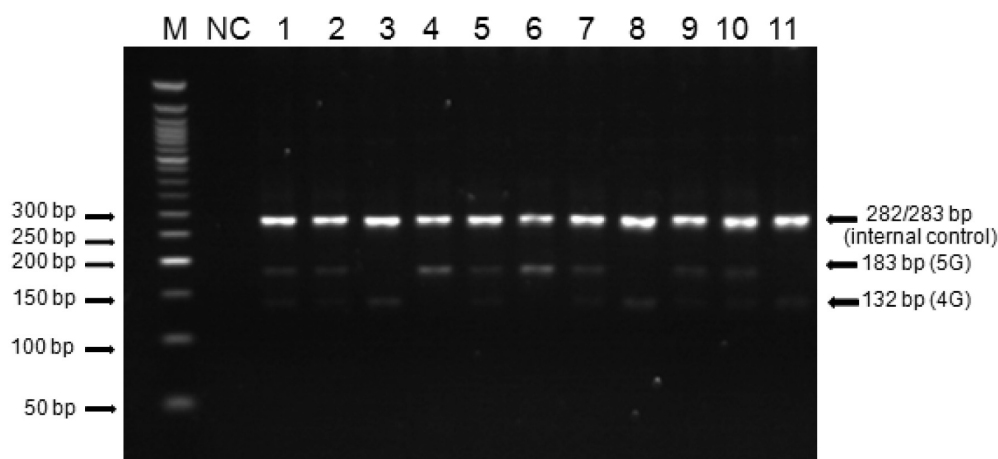
2. การเจาะเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำของอาสาสมัครที่งดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ในช่วงเวลาระหว่าง 5.30-6.30 นาฬิกา โดยใช้ 3.2 % trisodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็งเพื่อเตรียมเป็นพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อย (platelet poor plasma) ซึ่งจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งตรวจวัด ส่วนเม็ดเลือดอัดแน่นที่เหลืออยู่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Flexi gene DNA kit (QIAGEN, Germany) ใช้ซีรัมที่เตรียมจากเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งเพื่อวัดระดับของไขมันในเลือด และระดับของอินซูลิน สำหรับการวัดระดับน้ำตาลในเลือดใช้ sodium fluoride เป็นสารกันเลือดแข็ง

3. การตรวจโพลีเมอร์ฟิซึม 4G/5G ของยีน PAI-1

การตรวจจีโนไทป์ของโพลีเมอร์ฟิซึม 4G/5G ของยีน PAI-1 ใช้เทคนิค multiplex allele specific- polymerase chain reaction (AS-PCR) ซึ่ง primer ที่ใช้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ control forward primer (4G/5G-OF); 5' CT-TACACGTTGGTCTCCTGTTTCC 3', control reverse primer (4G/5G-OR); 5' AGCCAGCCACGTGATTGTCTAG 3', forward primer for 4G allele (4G-IF); 5' AGAGTCTGGACACGTGGTGA 3', และ reverse primer for 5G allele (5G-IR); 5'GATGATACACG-GCTGACTCCTCC 3' (Pacific science, Thailand) สำหรับส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวม 25 μ L

ประกอบด้วย 4G-IF และ 5G-IR primer ความเข้มข้น 0.4 μ M, 4G/5G-OF และ 4G/5G-OR ความเข้มข้น 0.2 μ M, dNTPs ความเข้มข้น 100 μ M (Promega, USA), 1X PCR buffer, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.2 mM (QIAGEN, Germany), *Taq* polymerase 0.5 unit (QIAGEN, Germany) และดีเอ็นเอ 100 ng ทำ PCR โดยใช้เครื่อง thermal cycler (PTC-100; MJ Research, Inc., USA and G-storm, Gene Technology, UK) ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที และ PCR 32 รอบ โดยมี denaturation ที่ 94 °C 35 วินาที annealing ที่ 55 °C 35 วินาที และ extension ที่ 72 °C 70 วินาที ในขั้นตอนสุดท้ายจะทำ final extension ที่ 72 °C เป็นระยะเวลา 4 นาที 30 วินาที ในแต่ละครั้งของการทำ PCR จะทำ no template control โดยการเติมน้ำแทนดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้โดยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel (ISCBioExpress, USA) ที่มีความเข้มข้น 2.0 % ซึ่งมีส่วนผสมของ ethidium bromide (Promega, USA) ความเข้มข้น 0.4 μ g/mL ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ที่ 100 mV เป็นเวลา 40 นาที และตรวจสอบผลที่ได้ด้วย UV transilluminator (Dolphin-DOC; Wealtec, USA) โดยทุกปฏิกิริยาจะต้องมีแถบดีเอ็นเอขนาด 282/283 bp ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอควบคุม และหากมีอัลลีล 4G จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 138 bp สำหรับอัลลีล 5G จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 182 bp (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 จีโนไทป์ของโพลีเมอร์ฟิซึมของยีน PAI-1 4G/5G บน 2 % agarose gel electrophoresis M = 50 bp ladder; NC = no template control; lane 1, 2, 5, 7, 9, 10 = 4G/5G genotype; lane 3, 8, 11 = 4G/4G genotype; lane 4, 6 = 5G/5G genotype

4. การตรวจวัดระดับของ PAI-1 ในพลาสมา

ตรวจวัดระดับของ PAI-1 ในพลาสมาโดยใช้เทคนิค in-house enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) โดยใช้แอนติบอดีจากชุดตรวจ human Serpin E1/PAI-1 DuoSet (R&D system, USA) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ capture antibody (mouse anti-human Serpin E1), detection antibody (biotinylated goat anti-human Serpin E1), streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (HRP), H_2O_2 , tetramethylbenzidine (TMB) และ PAI-1 standard โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการตรวจวัดโดยการทำ checkerboard titration ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (capture antibody) และตัวที่สอง (detection antibody) คือ 8 $\mu\text{g/mL}$ และ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แล้วทำการตรวจวัดระดับ

ของ PAI-1 ในพลาสมาควบคุมได้ค่า within และ between run CV เท่ากับร้อยละ 4.49 และ 14.01 ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วย one sample Kolmogorov-Smirnov test หากข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ จะแปลงข้อมูลเป็นค่า log 10 ก่อน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่เป็นค่าต่อเนื่องระหว่างสองกลุ่มด้วย independent-sample t-test หากกลุ่มตัวอย่างมีสามกลุ่มขึ้นไปวิเคราะห์ด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) สำหรับข้อมูลเชิงกลุ่ม วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ chi-square การวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษานี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

ตารางที่ 2 ความถี่จีโนไทป์ของพอลิมอร์ฟิซึม PAI-1 4G/5G กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD

CAD risk factors	4G/4G	4G/5G	5G/5G	P - value ^a	4G carrier	P - value ^b
Dyslipidemia (n = 127)						
-Normolipidemia (n = 24)	8 (19.5 %)	12 (18.8 %)	4 (18.2 %)	0.925	20 (19.0 %)	0.925
-Dyslipidemia (n = 103)	33 (80.5 %)	52 (80.3 %)	18 (81.8 %)		85 (81.0 %)	
Diabetic mellitus (n = 127)						
-non-DM (n = 100)	31 (75.6 %)	57 (79.7 %)	18 (81.8 %)	0.819	82 (78.1 %)	0.698
-DM (n = 27)	10 (24.4 %)	13 (20.3 %)	18 (18.2 %)		23 (21.9 %)	
Hypertension (n = 127)						
-non-HT (n = 32)	10 (24.4 %)	16 (25.0 %)	6 (27.3 %)	0.968	26 (24.8 %)	0.805
-HT (n = 95)	31 (75.6 %)	48 (75.0 %)	16 (72.7 %)		79 (75.2 %)	
Obesity (n = 127)						
-non-obesity (n = 75)	29 (70.7 %)	35 (54.7 %)	11 (50.0 %)	0.168	64 (61.0 %)	0.342
-Obesity (n = 52)	12 (29.3 %)	29 (45.3 %)	11 (50.0 %)		41 (39.0 %)	
Visceral obesity (n = 73)						
-non-visceral obesity	17 (41.5 %)	25 (39.1 %)	7 (31.8 %)	0.787	42 (40.0 %)	0.580
-Visceral obesity	7 (17.1 %)	14 (21.9 %)	3 (13.6 %)		21 (20.0 %)	
MS (n = 120)						
Non-MS (n = 19)	5 (12.5%)	11 (18.0%)	3 (15.8%)	0.758	16 (15.8 %)	0.995
MS (n = 101)	35 (87.5%)	50 (82.0%)	15 (84.2%)		85 (84.2 %)	

^a: เปรียบเทียบระหว่างจีโนไทป์ทั้ง 3 จีโนไทป์

^b: เปรียบเทียบระหว่าง 4G carrier กับ homozygous 5G/5G

ตารางที่ 3 ระดับของสารชีวเคมีที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ในแต่ละจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1

Variables	4G/4G (n = 41)	4G/5G (n = 64)	5G/5G (n = 22)	P -value ^a	4G carrier (n = 105)	P - value ^b
FBS* (mg/dL)	99.7 ± 26.2	102.2 ± 47.5	99.7 ± 41.0	0.882	101.2 ± 40.4	0.817
SBP (mmHg)	125.7 ± 16.6	128.5 ± 20.1	129.5 ± 14.2	0.668	127.4 ± 18.8	0.633
DBP (mmHg)	72.3 ± 9.3	73.2 ± 8.9	74.7 ± 9.9	0.574	72.9 ± 9.0	0.349
TG (mg/dL)	149.1 ± 75.2	170.2 ± 87.3	117.7 ± 45.6	0.024	162.0 ± 83.1	0.001
TC (mg/dL)	179.8 ± 36.9	173.7 ± 45.1	139.1 ± 48.2	0.001	176.1 ± 42.0	< 0.001
HDL-C* (mg/dL)	44.8 ± 14.6	43.0 ± 15.7	44.1 ± 14.8	0.821	43.7 ± 15.2	0.909
LDL-C (mg/dL)	100.2 ± 30.6	94.6 ± 37.9	74.3 ± 34.2	0.020	96.8 ± 35.2	0.007
TC/HDL-C	4.1 ± 1.2	4.2 ± 1.5	3.2 ± 1.3	0.019	4.1 ± 1.4	0.005
Insulin (μIU/mL)	15.2 ± 7.2	17.4 ± 8.0	16.7 ± 8.2	0.422	16.6 ± 8.4	0.949

แสดงค่าเป็น mean ± SD ยกเว้นที่มีเครื่องหมาย * แสดงค่าเป็น geometric mean ± SD

^a: เปรียบเทียบระหว่างจีโนไทป์ทั้ง 3 จีโนไทป์

^b: เปรียบเทียบระหว่าง 4G carrier กับ homozygous 5G/5G

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ PAI-1 กับระดับของไขมันในเลือดซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD

Variables	PAI-1 antigen level (ng/mL)	
	Correlation coefficients (r)	P - value
TC (mg/dL)	0.285	0.016
TG (mg/dL)	0.279	0.019
LDL-C (mg/dL)	0.353	0.002
TC/HDL-C	0.419	0.001

ตารางที่ 5 ระดับของ PAI-1 ในแต่ละจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1

Genotypes	PAI-1 Ag levels (ng/mL)*	P - value
4G/4G, (n = 23)	10.1 ± 7.9	0.752
4G/5G, (n = 37)	9.2 ± 6.8	
5G/5G, (n = 11)	8.3 ± 4.4	
4G allele carriers, (n = 60)	9.6 ± 7.2	0.569
5G/5G, (n = 11)	8.3 ± 4.4	

* แสดงค่าเป็น mean ± SD

ผลการศึกษา

จากผลการตรวจโพลีเมอร์พีซีเอ็ม 4G/5G ของจีน PAI-1 พบว่า ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด 131 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์ 4G/4G, 4G/5G และ 5G/5G เท่ากับร้อยละ 32.3, 50.4 และ 17.3 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตาม Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.749$) เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของจีโนไทป์ต่าง ๆ โดยจำแนกตามปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วน และกลุ่มอาการเมแทบอลิก พบว่าสัดส่วนของจีโนไทป์ต่าง ๆ ในกลุ่มที่มีปัจจัยเสี่ยงแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบระดับสารชีวเคมีในเลือดที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ระหว่างผู้ที่มีอัลลีล 4G กับผู้ที่มีจีโนไทป์ 5G/5G พบว่าผู้ที่มีอัลลีล 4G มีระดับของ TC, TG, LDL-C และ TC/HDL-C สูงกว่าผู้ที่เป็น homozygous 5G/5G

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของระดับสารชีวเคมีเหล่านี้กับระดับของ PAI-1 พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

จากผลการตรวจวัดระดับของ PAI-1 ในกลุ่มผู้มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด CAD พบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ 4G/4G มีระดับของ PAI-1 สูงที่สุด ตามด้วยผู้ที่มีจีโนไทป์ 4G/5G และ 5G/5G ตามลำดับ และยังพบว่าผู้ที่มีอัลลีล 4G มีระดับของ PAI-1 สูงกว่าผู้ที่เป็น homozygous 5G/5G แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบระดับของ PAI-1 ในผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD พบว่าผู้ที่มีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ภาวะอ้วน กลุ่มอาการเมแทบอลิก และผู้สูบบุหรี่ มีระดับของ PAI-1 สูงกว่าผู้ที่ไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระดับของ PAI-1 ในผู้ที่มีและไม่มีปัจจัยเสี่ยงของการเกิด CAD

CAD risk factors	PAI-1 Ag levels (ng/mL)*	P - value
Dyslipidemia, (n = 72)		
-Normolipidemia, (n = 12)	9.2 ± 6.9	0.899
-Dyslipidemia, (n = 60)	9.5 ± 6.8	
Diabetic mellitus, (n = 72)		
-non-DM, (n = 55)	9.2 ± 7.5	0.589
-DM, (n = 17)	10.2 ± 3.5	
Hypertension (n = 72)		
-non-HT, (n = 21)	10.2 ± 8.3	0.533
-HT, (n = 51)	9.1 ± 6.1	
Obesity, (n = 72)		
-non-obesity, (n = 42)	8.5 ± 6.7	0.162
-Obesity, (n = 30)	10.7 ± 6.8	
Visceral obesity, (n = 39)		
-non-visceral obesity, (n = 31)	9.6 ± 6.5	0.177
-Visceral obesity, (n = 8)	13.6 ± 10.0	
Metabolic syndromes, (n = 67)		
Non-MS, (n = 12)	9.4 ± 7.5	0.897
MS, (n = 55)	9.7 ± 6.9	
Smoking, (n = 70)		
Non-smoking, (n = 57)	8.6 ± 5.5	0.155
Smoking, (n = 13)	11.7 ± 6.8	

* แสดงค่าเป็น mean ± SD

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

PAI-1 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการละลายลิ่มเลือด และยังมีบทบาทในการเจริญของรอยโรค CAD โดยการยับยั้ง vascular smooth muscle cells (VSMC) migration⁽⁵⁾ ระดับของ PAI-1 ในพลาสมาที่สูงขึ้นจึงมีผลต่อขนาดการตีบของหลอดเลือดหัวใจร่วมกับการเกิดการละลายลิ่มเลือดที่ช้าลงจึงเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดอาการแทรกซ้อนของ CAD ได้ เช่น อาการกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction; MI) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าผู้ที่มียีนไทป์ 4G/4G หรืออัลลีล 4G มีระดับของ PAI-1 ในพลาสมาสูงกว่าจีโนไทป์อื่น^(7, 12) และมีความสัมพันธ์กับการเกิด CAD จากการศึกษาของ Onalan และคณะ⁽¹³⁾ พบว่าผู้ที่มียีนไทป์ 4G/4G มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิด MI (OR = 2.67, 95%CI = 1.43-4.96) แต่มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงในการเกิด stable CAD (OR = 0.52, 95%CI = 0.29-0.92) ในการศึกษาในชาวสวีเดนพบว่า 4G/4G homozygous มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิด ischemic stroke (OR = 1.87, 95%CI = 1.12-3.15)⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในชาวเอเชีย เช่น ชาวเกาหลี⁽²¹⁾ และชาวจีน⁽⁷⁾ ไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิด CAD และโรคความดันโลหิตสูง Naran และคณะ⁽¹²⁾ พบว่าระดับของ PAI-1 ในพลาสมาของผู้ที่มีกลุ่มอาการเมแทบอลิก ขึ้นอยู่กับพอลิมอร์ฟิซึมและเชื้อชาติ โดยในชาว Indian African, White African และ Afro African มียีนไทป์ 4G/4G เป็นร้อยละ 33.9, 36.4 และ 2.8 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์แบบ meta-analysis พบว่าจีโนไทป์ 4G/4G สัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิด MI เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (OR = 1.20, 95%CI = 1.04-1.37)⁽²²⁾

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งเป็นการศึกษาในกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการเกิด CAD สูงชาวไทย พบว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ 4G/4G, 4G/5G และ 5G/5G เท่ากับร้อยละ 32.3, 50.4 และ 17.3 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาในคนไทยปกติของไทยโดยนันทรัตน์ โหมมานะสิน และคณะ ซึ่งมีความถี่จีโนไทป์ เท่ากับ 34.8, 48.2 และ 17.0 ตามลำดับ (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกับความถี่จีโนไทป์ที่พบในชาวคอเคเซียน⁽¹²⁾ ออสเตรเลีย⁽²³⁾ และญี่ปุ่น⁽²⁴⁾ แต่แตกต่างจากชาวแอฟริกันซึ่งพบจีโนไทป์ 5G/5G ร้อยละ 77.6⁽¹²⁾ และในชาวอินเดียร้อยละ 26.4⁽¹²⁾ ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าพอลิมอร์ฟิซึมนี้จะไม่มีความสัมพันธ์กับการมีความเสี่ยงสูงต่อ

การเกิด CAD แต่ก็มีแนวโน้มที่จะทำการศึกษาในคนไทยเนื่องจากผลการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเชื้อชาติเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความถี่จีโนไทป์

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมกับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ซึ่งได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน กลุ่มอาการเมแทบอลิก การสูบบุหรี่ อ้วน หรืออ้วนลงพุง ปรากฏว่าไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับ PAI-1 ในแต่ละจีโนไทป์ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากอาสาสมัครส่วนใหญ่ที่เข้าร่วมการศึกษาค้นนี้เป็นผู้ที่ได้รับยาลดระดับไขมันในเลือดกลุ่ม statin (ร้อยละ 25.4) และยาลดความดันโลหิตกลุ่ม angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor (ร้อยละ 70.5) ทำให้ระดับของ PAI-1 ในการศึกษาครั้งนี้ต่ำกว่าในการศึกษาอื่น^(7, 25) เพราะนอกเหนือจากพอลิมอร์ฟิซึม 4G/5G แล้ว ระดับของ PAI-1 ยังถูกควบคุมด้วยปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ อีก เช่น ระดับ TG⁽²⁰⁾ อินซูลิน น้ำตาลในเลือด⁽²⁶⁾ และ angiotensin II⁽¹¹⁾ จึงไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนในการศึกษานี้ แต่ที่น่าสนใจคือ พบว่าทั้งพอลิมอร์ฟิซึมและระดับของ PAI-1 ในพลาสมา มีความสัมพันธ์กับระดับไขมันในเลือด โดยในผู้ที่มียีนไทป์ 4G/4G มีระดับของ PAI-1 และระดับของ TC, TG, LDL-C และ TC/HDL-C สูงกว่าผู้ที่เป็น homozygous 5G/5G อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเมื่อพิจารณาระดับของไขมันในเลือดทั้ง 4 ชนิดโดยแยกตามจีโนไทป์ พบว่ามีเฉพาะ TC และ LDL-C เท่านั้นที่มีค่าสูงสุดในผู้ที่มียีนไทป์ 4G/4G และต่ำสุดในผู้ที่มียีนไทป์ 5G/5G ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าไขมันที่มีความสัมพันธ์กับระดับของ PAI-1 อย่างชัดเจนคือ TC และ LDL-C เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ PAI-1 ในพลาสมา กับระดับไขมันทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการมีระดับไขมันในเลือดสูงผิดปกติเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิด CAD และการที่ไม่พบความสัมพันธ์กับภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ นั้น เนื่องจากเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งซึ่งภาวะดังกล่าวคือการมีระดับของไขมันในเลือดชนิดใดชนิดหนึ่งผิดปกติ หรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ ซึ่งรวม HDL-C ด้วย และผลการวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์กับระดับของ HDL-C ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไขมันในเลือดกับระดับของ PAI-1 อธิบายได้ว่า TG และ LDL-C สามารถกระตุ้นการ transcription ของยีน PAI-1 ได้โดยผ่านทาง VLDL-inducible factor ไปกระตุ้นบริเวณ VLDL respon-

sive element บนส่วน promoter ของจีน PAI-1⁽²⁷⁾ ซึ่งอยู่เหลื่อมกันกับบริเวณโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1⁽²⁸⁾ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ผู้ที่มียีน 4G มีระดับของ PAI-1 สูงกว่าผู้ที่เป็น homozygous 5G/5G ความสัมพันธ์ระหว่าง TC กับระดับ PAI-1 นั้น อาจไม่ได้เกิดจากการที่ TC ไปมีผลต่อจีน PAI-1 โดยตรงแต่อาจเกิดจากการมี linkage disequilibrium ระหว่างจีน PAI-1 กับ จีน paraoxonase ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคลอเลสเทอรอลและอยู่บนโครโมโซมที่ 7q21.3 เช่นเดียวกันกับจีน PAI-1⁽²⁹⁾

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโพลีมอร์ฟิซึม 4G/5G ของจีน PAI-1 และระดับของ PAI-1 ในพลาสมาของผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด CAD แม้ว่าจะไม่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD หลาย ๆ ปัจจัย แต่ยีน 4G และระดับของ PAI-1 ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับไขมันในเลือดชนิด TC, TG และ LDL-C ที่สูงกว่าปกติ ซึ่งการพบความผิดปกติทั้ง 2 อย่างร่วมกันอาจทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CAD แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดคือกลุ่มประชากรมีขนาดเล็ก การศึกษาเพิ่มเติมในประชากรกลุ่มใหญ่ขึ้น หรือการตรวจวัดระบบการละลายลิ่มเลือดแบบองค์รวม (global fibrinolysis) อาจจำเป็นเพื่อยืนยันผลการศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่เข้าร่วมโครงการเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดและวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด และขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนครุภัณฑ์อุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนวิจัยสำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษาเพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนอุดหนุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนจากกลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Cardiovascular diseases (CVDs) [database on the Internet]. World Health Organization. 2011. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/>

factsheets/fs317/en/index.html.

2. Number of deaths by leading cause of death and sex, whole kingdom: 2003 - 2010. Office of the Permanent Secretary for Public Health, Ministry of Public Health of Thailand 2010.
3. Black HR. Cardiovascular risk factors: Yale University School of Medicine; 2002.
4. Risk Factors for Coronary Artery Disease [database on the Internet]. Medscape Reference. 2012. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/164163-overview#showall>.
5. Ha H, Oh EY, Lee HB. The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 203-11.
6. Chandler WL. The human fibrinolytic system. *Crit Rev Oncol Hematol* 1996; 24: 27-45.
7. Jeng JR. Association of PAI-1 gene promoter 4g/5g polymorphism with plasma PAI-1 activity in Chinese patients with and without hypertension. *Am J Hypertens* 2003; 16: 290-6.
8. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1990; 322: 882-9.
9. Tsangaris I, Tsantes A, Bagos P, Nikolopoulos G, Kroupis C, Kopterides P, et al. The effect of plasma homocysteine levels on clinical outcomes of patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Am J Med Sci* 2009; 338: 474-7.
10. Brazionis L, Rowley K, Jenkins A, Itsiopoulos C, O'Dea K. Plasminogen activator inhibitor-1 activity in type 2 diabetes: a different relationship with coronary heart disease and diabetic retinopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 786-91.
11. Roncal C, Orbe J, Rodriguez JA, Belzunce M, Belouqui O, Diez J, et al. Influence of the 4G/5G PAI-1 genotype on angiotensin II-stimulated human endothelial cells and in patients with hypertension. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 176-85.

12. Naran NH, Chetty N, Crowther NJ. The influence of metabolic syndrome components on plasma PAI-1 concentrations is modified by the PAI-1 4G/5G genotype and ethnicity. *Atherosclerosis* 2008; 196: 155-63.
13. Onalan O, Balta G, Oto A, Kabakci G, Tokgozoglu L, Aytemir K, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/4G genotype is associated with myocardial infarction but not with stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 26: 211-7.
14. Rallidis LS, Gialeraki A, Merkouri E, Liakos G, Dagres N, Sionis D, et al. Reduced carriership of 4G allele of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in very young survivors of myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 2010; 29: 497-502.
15. Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1983-92.
16. WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation 1999.
17. Kenney JJ. New NCEP Cholesterol Guidelines. Food & Health Communications, Inc 2003.
18. WHO. Redefining obesity and its treatment. World Health Organization 2000.
19. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman II, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-5.
20. Wiklund PG, Nilsson L, Ardnor SN, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. *Stroke* 2005; 36: 1661-5.
21. Song J, Yoon YM, Jung HJ, Hong SH, Park H, Kim JQ. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and coagulation factor VII Arg353-->Gln polymorphism in Korean patients with coronary artery disease. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 146-52.
22. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006; 367: 651-8.
23. Attia J, Thakkestian A, Wang Y, Lincz L, Parsons M, Sturm J, et al. The PAI-1 4G/5G gene polymorphism and ischemic stroke: an association study and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2007; 16: 173-9.
24. Kobashi G, Ohta K, Yamada H, Hata A, Minakami H, Sakuragi N, et al. 4G/5G variant of plasminogen activator inhibitor-1 gene and severe pregnancy-induced hypertension: subgroup analyses of variants of angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase. *J Epidemiol* 2009; 19: 275-80.
25. Isordia-Salas I, Leanos-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sanchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62: 365-72.
26. Dimova EY, Kietzmann T. Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver. *Thromb Haemost* 2008; 100: 992-1006.
27. Allison BA, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A, Eriksson P. Effects of native, triglyceride-enriched, and oxidatively modified LDL on plas-

- minogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1354-60.
28. Grant PJ. Polymorphisms of coagulation/fibrinolysis genes: gene environment interactions and vascular risk. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 57: 473-7.
29. Boncoraglio GB, Bodini A, Brambilla C, Carriero MR, Ciusani E, Parati EA. An effect of the PAI-1 4G/5G polymorphism on cholesterol levels may explain conflicting associations with myocardial infarction and stroke. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22: 191-5.