

ความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลลีนเตตระไฮโดรโฟเลตรีดักเตสจีนโพลีมอร์ฟิซึม กับระดับโฮโมซิสเตอีนในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ

อังครัตน์ ศรีสุทัยบุญย์^{1,2}, นงนุช เศรษฐเสถียร^{2,3}, ชาสตร์ เศรษฐเสถียร^{2,4*}, นันทรัตน์ โบบานะสิน^{2,5},
ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์^{2,6}, พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร^{2,7}, เกษม ตันติพานิชธีระกุล^{2,7}, วิชัย เส้นทอง^{2,7}, ปิยทัศน์ กัศนาวิวัฒน์^{2,8}

Received: August 22, 2012

Revised & Accepted: October 8, 2012

บทคัดย่อ

เอนไซม์เมทิลลีนเตตระไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (MTHFR) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของโฮโมซิสเตอีน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับยีน *MTHFR* จะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดซึ่งมีผลชักนำให้เกิดการบาดเจ็บจากภาวะออกซิเดชันของเซลล์ผนังหลอดเลือดทำให้สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ของหลอดเลือดส่งผลให้เกิดกระบวนการ atherosclerosis การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีนโพลีมอร์ฟิซึมของเมทิลลีนเตตระไฮโดรโฟเลต รีดักเตสและระดับโฮโมซิสเตอีนในคนไทยที่ป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจโดยศึกษาในอาสาสมัครจำนวน 352 รายที่มีอาการเข้าข่ายโรคหลอดเลือดหัวใจและเข้ารับการตรวจโดยการทำการ coronary angiography ที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากผล coronary angiography แบ่งอาสาสมัครออกเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจจำนวน 206 รายและกลุ่มควบคุมจำนวน 146 ราย ตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของจีนเมทิลลีนเตตระไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (*MTHFR*) ชนิด *C677T* และ *A1298C* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และเทคนิค AS-PCR ตามลำดับ ตรวจวัดระดับโฮโมซิสเตอีนรวมในซีรัมด้วยวิธี DiazymeHomocysteine Enzymatic Assay Kit ผลการศึกษาพบว่าทั้งความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR C677T* และ *A1298C* ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ อย่างไรก็ตามพบว่าสัดส่วนความถี่ของผู้ที่เป็นพาหะอัลลีล *T* (*CT*, *TT*) ของ *MTHFR C677T*, มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างเพศชายที่มีระดับโฮโมซิสเตอีนสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีระดับต่ำกว่า เมื่อใช้ค่า cut off ของระดับโฮโมซิสเตอีนเท่ากับ 15 ไมโครโมลต่อลิตร หรือเมื่อแบ่งช่วงระดับของโฮโมซิสเตอีนออกเป็นสามช่วงคือที่

¹นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²กลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁶ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁷ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁸ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

ค่า ≤ 10 , ระหว่าง $> 10-15$ และ > 15 ไมโครโมลต่อลิตร ในขณะที่สัดส่วนความถี่ของพาหะ T อัลลีล จะมีค่าต่ำในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและในกลุ่มตัวอย่างเพศชายที่มีระดับโฮโมซิสเตอีนต่ำ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในกลุ่มตัวอย่างเพศหญิง ยังคงพบอีกว่าในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและกลุ่มตัวอย่างเฉพาะเพศชายที่มีอัลลีล T (CT , TT) มีค่าเฉลี่ยของระดับโฮโมซิสเตอีนรวมสูงกว่าในกลุ่มที่มี จีโนไทป์ CC ($P < 0.001$) และไม่พบลักษณะดังกล่าวในกลุ่มตัวอย่างเพศหญิง ส่วนโพลีมอร์ฟิซึมชนิด $A1298C$ กลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมกับระดับโฮโมซิสเตอีนรวมทั้งในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและกลุ่มที่แยกตามเพศชายและหญิง ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าโพลีมอร์ฟิซึมของจีนเมทิลีนเตตระไฮโดรโฟเลต รีดักเตสชนิด $C677T$ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับโฮโมซิสเตอีนรวมในกระแสเลือดซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ

คำสำคัญ: เมทิลีนเตตระไฮโดรโฟเลต รีดักเตส, โพลีมอร์ฟิซึม, ระดับโฮโมซิสเตอีนรวม

Association between methylenetetrahydrofolate reductase gene (*MTHFR*) polymorphisms and homocysteine level in Thai patients with coronary artery disease

Ingkarat Sarutipai boon^{1,2}, Nongnuch Settasatian^{2,3}, Chatri Settasatian^{2,4*}, Nantarat Komanasin^{2,5},
Upa Kukongwiriyan^{2,6}, Pongsak Intharapetch^{2,7}, KasemTantipanichtheerakul^{2,7}, Vichai Senthong^{2,7},
Pyatat Tatsanavivat^{2,8}

Abstract

Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) is a key regulatory enzyme in folate and homocysteine (Hcy) metabolisms. Mutation of *MTHFR* gene leads to the increased levels of Hcy. Elevated blood Hcy level may induce oxidative injury to vascular endothelial cells and impairs vascular function leading to atherosclerosis. The aim of the present study was to investigate the relationships between *MTHFR* polymorphisms and total homocysteine (tHcy) level in Thai patients with coronary artery disease (CAD). A case-control study was performed in 352 subjects who were clinically suspected of having CAD and were undergoing coronary angiography at Queen Sirikit Heart Center of the Northeast, Khon Kaen University. Based on angiographic results, 206 patients were categorized as CAD and 146 subjects were control. The polymorphisms of *MTHFR* C677T and A1298C were genotyped in subjects with CAD and control groups, using PCR-RFLP and AS-PCR techniques, respectively. Serum tHcy was determined using DiazymeHomocysteine Enzymatic Assay Kit (Diazyme, USA). The results demonstrated that the genotype and allele frequencies of *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms were not significantly different between control and CAD groups. Significant elevation of the relative frequency (%) of T carriers (CT, TT) of C677T polymorphism was observed in all subjects and in male alone with higher level of tHcy as compared with lower level, either by using tHcy cut-off point at 15 $\mu\text{mol/L}$ or by categorizing the tHcy concentration into 3 levels as ≤ 10 , >10-15 and > 15 $\mu\text{mol/L}$; a lower percentage

¹Postgraduate Student in Medical Science, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

²Cardiovascular Research Group, 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 Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

⁶Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

⁷Queen Sirikit Heart Center of the Northeast Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

⁸Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

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

of *T* carrier was always revealed in all subjects with lower level of tHcy. There was, however, no significant difference when observed in female subjects. In addition, the mean serum tHcy levels in the *T* carriers (*CT*, *TT*) of *C677T* were higher in all subjects as well as in male subjects alone ($P<0.001$) as compared with the *CC* genotype; there was apparently no difference observed in female subjects. There were no significant association between the *A1298C* polymorphism and serum tHcy, either by cut-off level or by mean level, as observed in all subjects as well as separated male and female groups. This study indicated that polymorphism of *MTHFR* *C677T* contributes to the risk of CAD by the effect on increase of blood tHcy concentration.

Keywords: Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), Polymorphisms, Total homocysteine (tHcy) level

บทนำ

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) เป็นสาเหตุสำคัญของความเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในทั่วโลก⁽¹⁾ ในประเทศไทยอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดหัวใจ ปี พ.ศ. 2539-2548 จาก 40.73 รายต่อประชากรแสนคน เพิ่มขึ้นเป็น 198.68 รายต่อประชากรแสนคน⁽²⁾ บ่งชี้ว่าเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญอันดับต้นของประเทศ โรคหลอดเลือดหัวใจมีสาเหตุสำคัญมาจากการเกิด atheromatous plaque ที่ผนังชั้นใน (intima) ของหลอดเลือดแดงโคโรนารี ส่งผลให้ผนังหลอดเลือดบริเวณที่เกิด plaque มีลักษณะหนาตัวขึ้น (sclerosis) การเกิด atheromatous plaque ทำให้ช่องทางเดินของหลอดเลือดตีบแคบลงมีผลกระทบต่อการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease; IHD) โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกันซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงได้แก่ อายุ เพศ ความอ้วน ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ การสูบบุหรี่ ระดับโฮโมซิสเตอีนสูงในเลือด และที่สำคัญคือปัจจัยทางด้านพันธุกรรม⁽³⁻⁵⁾ โฮโมซิสเตอีน (Hcy) เป็นกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบโดยเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทไธโอนีนซึ่งโดยปกติ Hcy ในร่างกายสามารถถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นเมทไธโอนีนได้โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของ Hcy ผ่าน remethylation pathway โดยอาศัยเอนไซม์หลักสองชนิดคือ methionine synthase (MS) และ methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) นอกจากนี้ Hcy จะถูกเปลี่ยนเป็น cysteine ผ่าน transsulfuration pathway โดยอาศัยเอนไซม์ cystathionine β -synthase (CBS) และ γ -cystathionase^(6,7) ระดับของ Hcy ในเลือดที่มีการศึกษาในคนปกติทั่วไปอยู่ ระหว่าง 5-15 ไมโครโมลต่อลิตร⁽⁸⁾ เนื่องจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของ Hcy มีวิตามินบี 12 และโฟเลตเป็นปัจจัยร่วม ดังนั้นระดับของ Hcy ในเลือดจึงเกี่ยวข้องกับระดับวิตามินบี 12 และโฟเลตซึ่งวิตามินดังกล่าวสามารถลดระดับ Hcy ในเลือดลงได้⁽⁹⁾ Hcy ที่พบในกระแสเลือดประกอบด้วยหลายรูปแบบ ได้แก่ reduced form พบเพียงร้อยละ 1 ที่เหลือเป็น oxidized form โดยร้อยละ 70 อยู่ในรูปที่ Hcy จับกับอัลบูมินและร้อยละ 30 อยู่ในรูปแบบที่จับกันเองของ Hcy (homocysteine dimer) หรือจับกับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ⁽¹⁰⁾ สำหรับการตรวจวัดระดับ Hcy ในทางคลินิกมีการแนะนำให้ตรวจวัดแบบ Hcy รวม (total homocysteine; tHcy)⁽¹¹⁾ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ

ระดับ tHcy ในเลือดหรือมีค่าสูงเกินกว่า 15 ไมโครโมลต่อลิตร เป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ เนื่องจากพบว่า Hcy มีผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ส่งผลให้การทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดผิดปกติไป (endothelial dysfunction) โดยมีการหลั่ง nitric oxide (NO) ลดลง⁽¹²⁾ เป็นผลให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดผิดปกติ Hcy ยังมีส่วนในการกระตุ้นการเกาะติดของเกล็ดเลือดที่ผนังหลอดเลือด⁽¹³⁾ และกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเพิ่มมากขึ้น⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเพิ่ม prothrombotic factor^(15, 16) ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด atherosclerosis ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ

methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการลดระดับของ Hcy โดยเปลี่ยนกลับไปเป็นเมทไธโอนีนโดยจีน *MTHFR* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 มีขนาด 20,374 bp ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ MTHFR และ polymorphisms ของจีนนี้ที่มีการศึกษาและพบว่ามีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ MTHFR คือ *C677T* (rs1801133) และ *A1298C* (rs1801131) โดย *C677T* เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง 677 (ลำดับบน cDNA) ใน exon ที่ 4 ของจีน *MTHFR* จากไซโตซีน (C) ไปเป็นไทมีน (T) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนลำดับที่ 222 ของเอนไซม์ MTHFR จากอะลานีน (A) ไปเป็นวาลีน (V) ทำให้เอนไซม์ที่สร้างได้มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อน (thermolabile enzyme)⁽¹⁷⁾ ซึ่งทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ tHcy ในเลือด โพลีมอร์ฟิซึมของจีน *MTHFR* อีกชนิดคือ *A1298C* ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 1298 จากอะดีนีน (A) เป็นไซโตซีน (C) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจากกลูตาเมต (E) ไปเป็นอะลานีน (A) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 429 ของเอนไซม์ MTHFR และส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์เช่นเดียวกันกับ *C677T*⁽¹⁸⁾ จากการที่โพลีมอร์ฟิซึมของจีน *MTHFR* มีผลกระทบต่อระดับของ Hcy ในกระแสเลือดซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิด CAD รวมทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวในคนไทยมาก่อน การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR* และระดับ tHcy ในผู้ป่วยคนไทยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น CAD

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

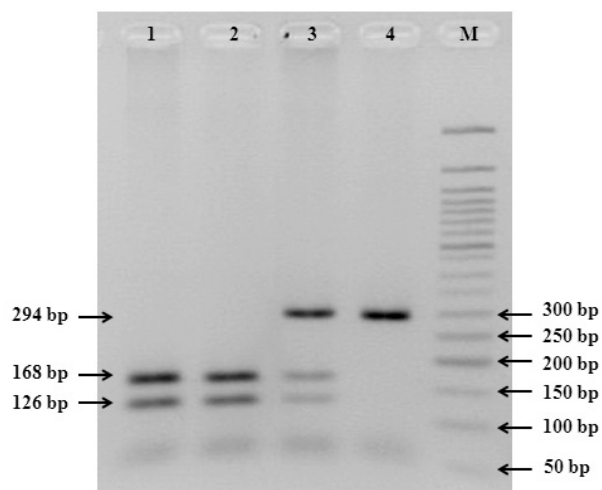
เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจรักษาโรคที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่นจำนวน 352 รายอายุ 35 ปีขึ้นไป โดยการศึกษาได้รับการรับรองจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์เลขที่ HE510414 จากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโดยอาสาสมัครทุกรายได้รับการชี้แจงเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการวิจัยจากคณะผู้วิจัยและลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยและอาสาสมัครทุกคนได้ตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับประวัติสุขภาพทั่วไป อาสาสมัครจะถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามผลการตรวจหลอดเลือดหัวใจโดยการทำการ coronary angiography คือ กลุ่ม CAD และกลุ่มควบคุมโดยกลุ่ม CAD จำนวน 206 รายมีค่าการตีบของหลอดเลือดโคโรนารีหลัก (main coronary arteries) มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 ($\geq 50\%$ stenosis) ตั้งแต่หนึ่งเส้นขึ้นไป (ได้แก่ left main coronary artery; LCA, left anterior descending; LAD, left circumflex artery; LCX และ right coronary artery; RCA) และต้องไม่มีโรคที่มีผลกระทบต่อระดับ Hcy ในเลือด ได้แก่ โรคตับ โรคไตและโรคเมร็งหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆนอกจากนี้ต้องไม่เป็นผู้ที่มีภาวะ unstable angina และ left ventricular hypertrophy และไม่ได้ทำ percutaneous coronary intervention หรือ stent implantation สำหรับกลุ่มควบคุมจำนวน 146 รายโดยผลการตรวจหลอดเลือดหัวใจ ไม่แสดงการตีบของหลอดเลือดโคโรนารีอย่างชัดเจน หรือมีค่าการตีบน้อยกว่าร้อยละ 50 และมีเกณฑ์ในการคัดออกเช่นเดียวกับกลุ่ม CAD

2. การเจาะเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด

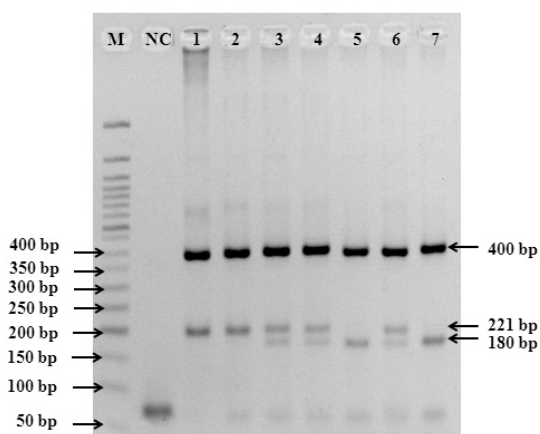
เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำของอาสาสมัครทั้งงดอาหารและเครื่องดื่มอย่างน้อย 12 ชั่วโมง โดยแบ่งเก็บเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิด ไตรโซเดียมซีเตรต 3.2 % และนำ packed cell มาใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA kit (QIAGEN, Germany) ส่วนซีรัมซึ่งเตรียมจากเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งถูกเก็บแยกเพื่อใช้ในการตรวจระดับของ tHcy โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูป Enzymatic Assay kit (Diasyme) การตรวจระดับไขมันในเลือด การตรวจระดับ high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) และระดับของอินซูลิน สำหรับการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดใช้ sodium fluoride เป็นสารกันเลือดแข็ง

3. การตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR*

ตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* ชนิด C677T ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้ forward และ reverse primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-CCT TGA ACA GGT GGA GGC CAG-3' และ 5'-GCG GTG AGA GTG GGG TGG AG-3' ตามลำดับ ส่วนผสมต่างๆในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย primer แต่ละชนิดความเข้มข้น 1 pmol, dNTPs (Promega) 0.2 mM, PCR buffer 1X (Invitrogen), $MgCl_2$ 1.75 mM (Invitrogen), *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) และดีเอ็นเอของกลุ่มตัวอย่าง 100 ng ทำ PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler G-strom (Gene Technology, UK) โดยมีขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาทีตามด้วย PCR cycle ที่อุณหภูมิ 95°C 30 วินาที, 65°C 30 วินาที และ 72°C วินาที จำนวน 30 รอบ และสำหรับ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นแบ่งผลผลิตจาก PCR ออกเป็น 2 หลอด หลอดละ 10 μ l แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I 8 unit ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยวิธี electrophoresis บน 2 % agarose gel ซึ่งในกรณีของอัลลีล C จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I ทำให้ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 294 bp ในขณะที่อัลลีล T ซึ่งมี restriction site ของเอนไซม์ *Hinf* I ทำให้ถูกย่อยได้แถบดีเอ็นเอขนาด 126 และ 168 bp (รูปที่ 1) สำหรับการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR* ชนิด A1298C ใช้เทคนิค nested allele-specific polymerase chain reaction (nested AS-PCR) ที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการศึกษานี้โดยใช้ primer 5 ชนิด คือ Forward (outer) 5'-CAT GCT TGT GGT TGA CCT GG-3' , Reverse (outer) 5'-CAC AGG ATG GGG AAG TCA CAG-3', Forward (A allele) 5'-GGA GGA GCT GAC CAG TGA TGA-3', Forward (C allele) 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACA GAA GCT TGA GGA GCT GAC CAG TGA TGC-3', และ nested primer (C allele) 5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACC AGG AAA CAG CTA TGA C-3' ซึ่งกรณีจีโนไทป์แบบ AA จะให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 180 และ 400 bp และจีโนไทป์ CC ให้ผลดีเอ็นเอขนาด 221 และ 400 bp ส่วนจีโนไทป์แบบ AC ให้ผลดีเอ็นเอขนาด 180, 221 และ 400 bp ดัง รูปที่ 2



รูปที่ 1 ผลการตรวจ DNA บน 2 % agarose gel electrophoresis แสดงจีโนไทป์ของจีน *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึมชนิด *C677T* : Lane 1, 2 = *TT* genotype; Lane 3 = *CT* genotype; Lane 4 = *CC* genotype; M = DNA size marker (50 bp DNA ladder)



รูปที่ 2 ผลการตรวจ DNA บน 2 % agarose gel electrophoresis แสดงจีโนไทป์ของจีน *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึมชนิด *A1298C* : M = DNA size marker (50 bp DNA ladder); NC = no template control; Lane 1, 2 = *CC* genotype; Lane 3, 4, 6 = *AC* genotype; lane 5, 7 = *AA* genotype

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 สำหรับการทดสอบการกระจายของข้อมูลใช้ Kolmogorov-Smirnov test โดยข้อมูลที่มีการกระจายแบบไม่ปกติจะถูกแปลงข้อมูลให้เป็นค่า log 10 ก่อนนำมาวิเคราะห์การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลซึ่งเป็นค่า

ต่อเนื่องระหว่างสองกลุ่มด้วย independent-sample *t*-test และมากกว่าสองกลุ่มขึ้นไปโดยใช้ ANOVA ส่วนข้อมูลเชิงกลุ่มวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Chi-square test การหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของจีน *MTHFR* กับระดับ tHcy ในกลุ่มตัวอย่างใช้ Logistic regression analysis เพื่อวิเคราะห์หา Odds ratio (OR) และยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$

ผลการศึกษา

การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับสารชีวเคมีต่างๆ ในเลือดรวมทั้งค่าตัวแปรต่างๆทางคลินิก ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มพบว่า อายุ, Waist/hip ratio, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), fasting blood sugar (FBS), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) ภาวะความดันโลหิตสูง (hypertention), dyslipidemia, diabetes mellitus (DM), สถานะการสูบบุหรี่ ในกลุ่ม CAD มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ HDL-C ในกลุ่ม CAD มีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนเพศของอาสาสมัครระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายความถี่ของจีโนไทป์ของจีน *MTHFR* ชนิด *C677T* โดยพบว่าจีโนไทป์ชนิด *CC* พบมากที่สุดในทุกกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD รองลงมาคือ *CT* และ *TT* ตามลำดับ ส่วนความถี่อัลลีล (allele frequency) *C* และ *T* ของกลุ่มควบคุมคือ ร้อยละ 87.6 และ 12.4 ตามลำดับ และในกลุ่ม CAD คือ ร้อยละ 86.6 และ 13.4 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความถี่ของทั้งจีโนไทป์และอัลลีลในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการกระจายความถี่ของจีโนไทป์ ชนิด *A1298C* พบว่าจีโนไทป์ชนิด *AA* พบมากที่สุดทั้งสองกลุ่มศึกษา รองลงมาคือ *AC* และ *CC* ตามลำดับ ส่วนความถี่อัลลีล *A* และ *C* ของกลุ่มควบคุมคือ ร้อยละ 69.8 และ 30.2 ตามลำดับ และในกลุ่ม CAD คือร้อยละ 70.7 และร้อยละ 29.3 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าความถี่ของทั้งจีโนไทป์และอัลลีลในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับ *C677T*

ตารางที่ 1 แสดงพารามิเตอร์ต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD

Parameters	Control group (n=146)			CAD group (n=206)			P - value ^e
	Total	Male (n = 61)	Female (n = 85)	Total	Male (n = 142)	Female (n = 64)	
Age (years) ^{a, c}	59.7 ± 9.2	59.6±9.6	59.8±8.9	61.9 ± 8.9	61.9±9.2	62.0±8.2	0.026
Gender %, (n)	-	30.0 (61)	-	-	70.0 (142)	-	<0.001
- Male (n=203)	-	-	57.0 (85)	-	-	43.0 (64)	
- Female (n=149)	-	133.3±20.38*	123.5±17.0*	-	132.1±18.3	128.9±16.2	0.078
SBP (mmHg) ^{a, c}	127.6 ± 19.0	133.3±20.38*	123.5±17.0*	131.1 ± 17.6	132.1±18.3	128.9±16.2	0.662
DBP (mmHg) ^{a, c}	73.2 ± 9.2	75.9± 9.6*	72.0±8.7*	73.8 ± 11.8	74.8±12.2*	71.3±10.5*	0.919
BMI (kg/m ²) ^{a, c}	24.6 ± 3.6	24.6 ±3.8	24.7±3.5	24.7 ± 3.3	24.7±3.3	24.6±3.3	0.005
Waist/hip ratio ^{a, c}	0.9 ± 0.1	1.0±0.07	0.9±0.7	1.0 ± 0.1	1.0±0.1*	0.9±0.1*	0.038
TC (mg/dL) ^{a, c}	168.8 ± 43.1	158.8±37.4*	175.9±45.6*	179.9 ± 50.9	172.7±42.5*	195.8±63.4*	<0.001
TG (mg/dL) ^{b, c}	131.9 ± 74.7	146.1±76.5*	122.8±72.2*	166.3±115.7	165.1±108.9	169.0±130.1	0.013
LDL-C (mg/dL) ^{a, c}	92.6 ± 35.6	83.3±31.0*	99.1±37.3*	103.2 ± 40.6	97.7±35.2*	115.4±48.8*	<0.001
HDL-C (mg/dL) ^{b, c}	43.1 ± 15.1	37.2±14.0**	47.8±14.5**	37.9 ± 10.1	37.0±9.7*	40.1±10.6*	0.010
FBS (mg/dL) ^{b, c}	100.4 ± 39.5	99.53±23.8	100.9±47.2	110.6 ± 54.5	105.9±41.0*	121.6±73.8*	0.002
BUN (mg/dL) ^{b, c}	12.5 ± 4.4	12.8±4.7	12.3±4.2	14.0 ± 5.3	14.2±5.1	13.7±5.7	0.002
Creatinine (mg/dL) ^{b, c}	0.9 ± 0.4	1.0±0.3**	0.8±0.4**	1.0 ± 0.4	1.0±0.4**	0.9±0.3**	0.391
TP (g/dL) ^{b, c}	7.6 ± 0.6	7.5±0.6	7.6±0.6	7.5 ± 1.2	7.4±1.5	7.6±0.5	0.289
Albumin (g/dL) ^{b, c}	4.2 ± 0.3	4.2±0.3	4.2±0.3	4.0 ± 1.1	4.1±1.3	4.0±0.3	0.908
Globulin (g/dL) ^{b, c}	3.4 ± 0.5	3.3±0.5	3.5±0.5	3.4 ± 5.2	3.3±6.3	3.5±0.4	0.184
ALT (U/L) ^{b, c}	22.4 ± 13.4	25.6±17.3*	19.1±9.1*	23.0 ± 19.7	25.6±21.2**	18.2±14.0**	0.542
AST (U/L) ^{b, c}	26.3 ± 12.0	27.7±14.5	25.4±10.0	25.5 ± 16.4	26.7±18.3*	23.2±10.5*	0.955
ALP (U/L) ^{b, c}	70.1 ± 22.2	71.9±27.7	68.9±17.3	69.9 ± 36.4	66.5±41.8*	78.5±18.6*	0.421
hs-CRP (mg/L) ^{b, c}	1.6 ± 9.7	1.5±13.4	1.6±5.6	1.7 ± 9.6	1.6±10.6	2.2±7.0	0.299
tHcy (μmol/L) ^{a, c}	11.9 ± 2.4	12.8±2.6*	11.3±2.1*	12.3 ± 2.8	12.3±2.8	12.1±2.9	0.002
Hypertension ^d (n=241) %, (n)	60.1 (86)	63.3 (38)	57.8 (48)	76.0 (155)	77.3 (109)	73.0 (46)	0.929
Obesity ^d (n=140) %, (n)	39.7 (58)	39.3 (24)	40.0 (34)	40.2 (82)	40.7 (57)	39.1 (25)	0.001
Dyslipidemia (n=175) %, (n)	40.6 (56)	54.4 (31)*	30.9 (25)*	59.2 (119)	60.4 (84)	56.5 (35)	0.001
DM ^d (n=102) %, (n)	21.0 (29)	23.2 (13)	19.5 (16)	36.9 (73)	30.7 (42)*	50.8 (31)*	0.014
Smoker ^d (n=118) %, (n)	26.4 (38)	60.7 (37)**	1.2 (1)**	39.0 (80)	56.0 (79)**	1.6 (1)**	

^a: ข้อมูลที่มีการกระจายแบบโค้งปกติแสดงเป็นค่า mean ± SD, ^b: ข้อมูลที่มีการกระจายแบบโค้งปกติแสดงเป็นค่า geometric mean ± SD^c; เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้ independent-sample *t*-test, ^d: เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้ Chi-square test, ^e: เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง CAD, *, P - value < 0.05, **: P - value < 0.001

ตารางที่ 2 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของยีน *MTHFR* (*C677T* และ *A1298C*) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD

<i>MTHFR</i> polymorphism	Control group	CAD group	<i>P</i> - value
<i>C677T</i>			
Genotype frequency (n = 347)	(n = 145)	(n = 202)	
<i>CC</i> %, (n)	77.9 (113)	75.2 (152)	
<i>CT</i> %, (n)	19.3 (28)	22.8 (46)	0.678
<i>TT</i> %, (n)	2.8 (4)	2.0 (4)	
Allele frequency (n = 694)	(n = 290)	(n = 404)	
<i>C</i> allele %, (n)	87.6 (254)	86.6 (350)	0.713
<i>T</i> allele %, (n)	12.4 (36)	13.4 (54)	
<i>A1298C</i>			
Genotype (n = 302)	(n = 126)	(n = 176)	
<i>AA</i> %, (n)	50.8 (64)	50.6 (89)	
<i>AC</i> %, (n)	38.1 (48)	40.3 (71)	0.820
<i>CC</i> %, (n)	11.1 (14)	9.1 (16)	
Allele (n = 604)	(n = 252)	(n = 352)	
<i>A</i> allele %, (n)	69.8 (176)	70.7 (249)	0.812
<i>C</i> allele %, (n)	30.2 (76)	29.3 (103)	

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR* ชนิด *C677T* กับระดับ tHcy ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด โดยใช้ค่า cut-off ที่ 15 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าความถี่เชิงเปรียบเทียบ (relative frequency) ของจีโนไทป์ชนิด *CC* มีค่าลดลงในขณะที่ *CT+TT* มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระดับ tHcy มีค่าสูงกว่า 15 ไมโครโมลต่อลิตร โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.002$) และทำให้จีโนไทป์แบบ *CT+TT* มีความเสี่ยง 3.34 เท่าเมื่อเทียบกับ *CC* ($OR = 3.34$; 95% $CI = 1.53-7.26$; $P = 0.002$) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์แยกตามเพศพบว่าลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงชัดเจนในกลุ่มเพศชาย ($OR = 3.54$; 95% $CI = 1.32-9.49$; $P = 0.012$) แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มตัวอย่างเพศหญิง ($OR = 3.04$; 95% $CI = 0.85-10.87$; $P = 0.087$) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR* ชนิด *A1298C* กับระดับของ tHcy โดยใช้ค่า cut-off ที่ 15 ไมโครโมล

ต่อลิตร ถึงแม้แนวโน้มของความถี่จีโนไทป์ชนิด *AA* มีค่าเพิ่มขึ้นส่วน *AC+CC* มีค่าลดลงเมื่อระดับ tHcy มีค่าสูงกว่า 15 ไมโครโมลต่อลิตรโดยแสดงให้เห็นทั้งในเพศชายและหญิงแต่กลับไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อแบ่งช่วงของระดับ tHcy ออกเป็นสามช่วงคือ ≤ 10 , $> 10-15$ และ > 15 ไมโครโมลต่อลิตร (ตารางที่ 3) พบว่าความถี่ (relative frequency) ของ *MTHFR C677T* ชนิด *CT+TT* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในขณะที่จีโนไทป์ชนิด *CC* มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระดับของ tHcy เพิ่มขึ้น ($P = 0.003$) ซึ่งให้ผลชัดเจนในกลุ่มตัวอย่างเพศชาย ($P = 0.011$) ส่วนในกลุ่มตัวอย่างเพศหญิงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความถี่จีโนไทป์ของ *A1298C* ชนิด *AA* และ *AC+CC* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้ง 3 ช่วงของระดับ tHcy ทั้งในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด และการแบ่งเป็นเพศชายและเพศหญิง

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* (*C677T* และ *A1298C*) และระดับโฮโมซิสเตอีนรวม

<i>MTHFR</i> polymorphism	tHcy (μmol/L)			<i>P</i> - value ^a
	≤ 10	> 10-15	> 15	
<i>C677T</i> genotype				
All subjects (n = 285)				
<i>CC</i> %, (n)	86.3 (44)	77.5 (158)	53.3 (16)	0.003
<i>CT+ TT</i> %, (n)	13.7 (7)	22.5 (46)	46.7 (14)	
Male (n = 167)				
<i>CC</i> %, (n)	91.3 (21)	77.6 (97)	52.6 (10)	0.011
<i>CT+TT</i> %, (n)	8.7 (2)	22.4 (28)	47.4 (9)	
Female (n = 118)				
<i>CC</i> %, (n)	82.1 (23)	77.2 (61)	54.5 (6)	0.179
<i>CT+TT</i> %, (n)	17.9 (5)	22.8 (18)	45.5 (5)	
<i>A1298C</i> genotype				
All subjects (n=251)				
<i>AA</i> %, (n)	42.6 (20)	50.8 (91)	56.0 (14)	0.485
<i>AC+CC</i> %, (n)	57.4 (27)	49.2 (88)	44.0 (11)	
Male (n=149)				
<i>AA</i> %, (n)	35.0 (7)	52.2 (59)	56.3 (9)	0.322
<i>AC+CC</i> %, (n)	65.0 (13)	47.8 (54)	43.8 (7)	
Female (n=102)				
<i>AA</i> %, (n)	48.1 (13)	48.5 (32)	55.6 (5)	0.919
<i>AC+CC</i> %, (n)	51.9 (14)	51.5 (34)	44.4 (4)	

^a: เปรียบเทียบระหว่างโฮโมซิสเตอีนรวมในแต่ละระดับโดยใช้ Chi-square test

ตารางที่ 4 แสดงผลของ *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึมต่อค่าเฉลี่ยของระดับ tHcy เปรียบเทียบกันระหว่าง wild types และ variants ของโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *C677T* และ *A1298C* ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด และการวิเคราะห์แยกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD พบว่าในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดที่มีจีโนไทป์ของ *C677T* แบบ *CT+TT* มีค่าเฉลี่ยของระดับ tHcy สูงกว่ากลุ่มที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ *CC* อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($P < 0.001$) ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวเมื่อแยกตามเพศพบว่ามีความนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างเพศชาย และเมื่อวิเคราะห์แยกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD ก็ให้ผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในเพศชายเช่นเดียวกันทั้งสองกลุ่ม ส่วนโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *A1298C* ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของระดับ tHcy ระหว่างจีโนไทป์ *AA* และ *AC+CC*

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับโฮโมซิสเตอีนรวมระหว่าง wild type และ variant type ของ *MTHFR* จินโพลีมอร์ฟิซึม (*C677T* และ *A1298C*) ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด กลุ่มควบคุม และกลุ่ม CAD

<i>MTHFR</i> polymorphism	Group	Genotype	tHcy levels; $\mu\text{mol/L}$ (Mean $\pm$ SD)		
			All subjects	Male	Female
<i>C677T</i>	All subjects (n = 285)	<i>CC</i>	11.8 $\pm$ 2.4	12.0 $\pm$ 2.4	11.5 $\pm$ 2.3
		<i>CT+TT</i>	13.2 $\pm$ 3.2	13.9 $\pm$ 3.3	12.2 $\pm$ 2.8
		<i>P - value</i> ^a	< 0.001	< 0.001	0.222
	Control (n = 119)	<i>CC</i>	11.7 $\pm$ 2.2	12.4 $\pm$ 2.3	11.2 $\pm$ 2.0
		<i>CT+TT</i>	12.8 $\pm$ 3.1	14.5 $\pm$ 3.5	11.8 $\pm$ 2.5
		<i>P - value</i> ^a	0.059	0.032	0.292
	CAD (n = 168)	<i>CC</i>	11.9 $\pm$ 2.5	11.9 $\pm$ 2.4	12.0 $\pm$ 2.7
		<i>CT+TT</i>	13.5 $\pm$ 3.3	13.8 $\pm$ 3.2	12.7 $\pm$ 3.3
		<i>P - value</i> ^a	0.001	0.001	0.446
<i>A1298C</i>	All subjects (n =251)	<i>AA</i>	12.2 $\pm$ 2.7	12.8 $\pm$ 2.8	11.4 $\pm$ 2.3
		<i>AC+CC</i>	11.9 $\pm$ 2.6	12.1 $\pm$ 2.5	11.6 $\pm$ 2.6
		<i>P - value</i> ^b	0.367	0.150	0.659
	Control (n = 107)	<i>AA</i>	11.9 $\pm$ 2.4	12.9 $\pm$ 2.7	11.2 $\pm$ 2.0
		<i>AC+CC</i>	11.9 $\pm$ 2.3	12.8 $\pm$ 2.0	11.4 $\pm$ 2.3
		<i>P - value</i> ^b	0.997	0.905	0.790
	CAD (n =146)	<i>AA</i>	12.5 $\pm$ 2.9	12.5 $\pm$ 2.9	11.7 $\pm$ 2.7
		<i>AC+CC</i>	11.9 $\pm$ 2.8	11.9 $\pm$ 2.6	12.0 $\pm$ 3.1
		<i>P - value</i> ^b	0.259	0.128	0.756

^a: เปรียบเทียบระหว่าง *CC* และ *CT+TT* โดยใช้ independent-sample *t*-test, ^b: เปรียบเทียบระหว่าง *AA* และ *AC+CC* โดยใช้ independent-sample *t*-test

เมื่อศึกษาผลกระทบร่วม (combined effect) ของ *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึม *C677T* และ *A1298C* ต่อค่าเฉลี่ยของระดับโฮโมซิสเตอีนรวม โดยเปรียบเทียบระหว่างแต่ละ combination ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและเมื่อแยกตามเพศ (ตารางที่ 5) พบว่ามีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ

ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและเฉพาะในเพศชายโดยพบว่ากลุ่มจีโนไทป์ร่วม *CC/AA* มีค่าเฉลี่ยของระดับ tHcy ต่ำสุดและเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับในกลุ่ม *CC/AC+CC*, *CT+TT/AC+CC* และ *CT+TT/AA* มีค่าเฉลี่ยของระดับ tHcy สูงสุด โดยในการศึกษานี้ไม่พบลักษณะจีโนไทป์ร่วมกันแบบ *CT+TT/CC*

ตารางที่ 5 ผลกระทบร่วม (combined effect) ของ *MTHFR* จีนโพลีมอร์ฟิซึม (*C677T* และ *A1298C*) ต่อค่าเฉลี่ยของระดับโฮโมซิสเตอีนรวม ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด

Genotypes	Hcy level; $\mu\text{mol/L}$ (Mean $\pm$ SD)		
	All subjects	Male	Female
<i>MTHFR C677T/A1298C</i>			
<i>CC/AA</i> (n=86)	11.6 $\pm$ 2.0	12.0 $\pm$ 1.9	11.1 $\pm$ 2.0
<i>CC/AC+CC</i> (n=108)	11.9 $\pm$ 2.6 ^{b1}	12.0 $\pm$ 2.6 ^{b2}	11.7 $\pm$ 2.7 ^{b3}
<i>CT+TT/AA</i> (n=41)	13.6 $\pm$ 3.4 ^{c1}	14.7 $\pm$ 3.5 ^{c2}	12.1 $\pm$ 2.5 ^{c3}
<i>CT+TT/AC+CC</i> (n=15)	12.2 $\pm$ 2.2 ^{d1}	12.8 $\pm$ 1.4 ^{d2}	11.4 $\pm$ 2.9 ^{d3}
<i>P - value</i>^a	< 0.001	< 0.001	0.508

^a: เปรียบเทียบโดยใช้ ANOVA, ^{b,c,d}: เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้ independent-sample *t*-test

^b: เปรียบเทียบระหว่าง *CC/AA* กับ *CC/AC+CC*; *P* - value = 0.423^{b1}, 0.905^{b2}, 0.258^{b3}

^c: เปรียบเทียบระหว่าง *CC/AC+CC* กับ *CT+TT/AA*; *P* - value = **0.001**^{c1}, < **0.001**^{c2}, 0.585^{c3}

^d: เปรียบเทียบระหว่าง *CT+TT/AA* กับ *CT+TT/AC+CC* ; *P* - value = 0.127^{d1}, 0.152^{d2}, 0.577^{d3}

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการศึกษาการเกิด CAD โดยอาจพบเป็นความสัมพันธ์ที่แสดงออกอย่างจำเพาะในสมาชิกของครอบครัว (familial disease) หรือ แสดงออกเป็นลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของจีนที่เกี่ยวข้องในประชากรทั่วไป ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือ โพลีมอร์ฟิซึมดังกล่าวมักจะพบที่มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ (ethnic group) ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR* ชนิด *C677T* และ *A1298C* กับระดับของ tHcy ในผู้ที่มารับการตรวจวินิจฉัย CAD ครั้งนี้ซึ่งเป็นการศึกษาในคนไทย พบว่าจีโนไทป์ของ *C677T* แบบ *CC* มีความถี่มากที่สุด (ร้อยละ 76.4) รองลงมาคือ *CT* (ร้อยละ 21.3) และ *TT* มีความถี่ต่ำสุด (ร้อยละ 2.3) โดยการกระจายความถี่ของจีโนไทป์ดังกล่าวมีความแตกต่างจากที่รายงานในชาวญี่ปุ่นและเกาหลีอย่างมากแต่กลับมีลักษณะการกระจายความถี่คล้ายคลึงกับที่พบในชาว อินเดีย ตุนิเซีย และ แคนาดา⁽¹⁹⁻²³⁾ อย่างไรก็ตามมีผลใกล้เคียงกับที่มีรายงานในคนไทยก่อนหน้านี้อย่างน้อย 2 กลุ่ม^(24, 25) สำหรับความถี่จีโนไทป์ของ *A1298C* ที่พบมากที่สุดคือ *AA* (ร้อยละ 50.7) รองลงมาคือ *AC* (ร้อยละ 39.4) และ *CC* (ร้อยละ 9.9) ซึ่งให้ผลการศึกษาที่คล้ายคลึงกับที่มีการรายงานในเชื้อชาติอื่นๆ^(19, 20, 22) แต่จากที่มีการศึกษาในคนไทยโดย Promthet

และคณะพบว่า การกระจายความถี่ของจีโนไทป์ชนิด *AC* สูงที่สุด (ร้อยละ 54.6) รองลงมาคือ *AA* (ร้อยละ 41.5) และ *CC* (ร้อยละ 3.9)⁽²⁵⁾ ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างกันของการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา

การศึกษานี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของ *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึม ชนิด *C677T* และ *A1298C* ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม CAD ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการศึกษาในกลุ่มชนชาวอาหรับ⁽²⁶⁾ ชาวบราซิล⁽²⁷⁾ และกลุ่มชนทางภาคเหนือของประเทศอินเดีย⁽²⁸⁾ แต่จากการศึกษาของ Vijaya Lakshmi และคณะโดยศึกษาในชาวอินเดียพบว่าโพลีมอร์ฟิซึม ชนิด *C677T* โดย *T* allele อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CAD ได้ 1.61 เท่า (95% CI: 1.04-2.50)⁽²⁹⁾ สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR* ทั้งสองชนิดนี้อาจไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิด CAD แต่อาจมีผลต่อกระบวนการเกิดโรคเนื่องจากในกระบวนการเกิดโรคมีปัจจัยเสี่ยงร่วมกันหลายปัจจัยและภาวะที่มีระดับ tHcy สูงในเลือด (hyperhomocysteinemia) มีบทบาททำให้เกิดภาวะ oxidative stress และ endothelial dysfunction ซึ่งเป็นกระบวนการในระยะแรกของการเกิด atherosclerosis ของหลอดเลือดโคโรนารี ดังนั้นจึงอาจเกิดจากตัวอย่างในการศึกษานี้มีความแตกต่างกันเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างควบคุมเป็นกลุ่มผู้ที่เข้ารับการตรวจรักษาในโรงพยาบาลซึ่งประกอบด้วยผู้ที่ไม่แสดงการตีบ

ของหลอดเลือดหัวใจ และที่มีการตีบของหลอดเลือดหัวใจ น้อยกว่าร้อยละ 50 บ่งบอกว่าได้มีการเกิด atherosclerosis แล้วแต่มีความรุนแรงน้อยกว่ากลุ่ม CAD ดังนั้นจึงไม่ใช้กลุ่ม สุขภาพดี

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึมชนิด *C677T* กับระดับของ tHcy โดยกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เป็น variant carrier (*CT+TT*) มีระดับของ tHcy ที่สูงกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ wild type (*CC*) อย่างมีนัยสำคัญซึ่งให้ผลยืนยันกันจาก ทั้งการวิเคราะห์โดยใช้ค่า cut-off หรือการกำหนดช่วงของ ระดับ tHcy รวมทั้งการวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยตรงระหว่าง จีโนไทป์กับระดับของ tHcy ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ จาก *C* ไปเป็น *T* ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของของกรดอะมิโน จาก อะดีนีนไปเป็นวาเลอีนส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์ชนิดไม่ ทนความร้อน⁽¹⁷⁾ ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์จึงทำให้ ระดับ tHcy ในเลือดสูงขึ้น แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว ในกลุ่มตัวอย่างเพศหญิงซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ที่มีผล กระทบต่อระดับ tHcy โดยจากที่มีการศึกษาได้แก่ ฮอร์โมน เอสโตรเจน⁽³⁰⁾ระดับวิตามิน บี 6, บี 12, และโฟเลต⁽³¹⁾ เนื่องจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของโฮโมซิสเตอีนมีวิตามิน บี12 และโฟเลตเป็นปัจจัยร่วม ดังนั้นระดับของ Hcy ในเลือดจึง เกี่ยวข้องกับระดับวิตามินบี 12 และโฟเลตซึ่งวิตามินดังกล่าว สามารถลดระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดลงได้⁽⁹⁾ ในการศึกษา ครั้งนี้ไม่ได้มีการตรวจวัดระดับวิตามินดังกล่าวในซีรัมของ ตัวอย่างศึกษา สำหรับโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *A1298C* ไม่พบ ความสัมพันธ์กับระดับ tHcy ในซีรัมเช่นเดียวกับการศึกษาของ Friedman และคณะซึ่งไม่พบว่าจีโนไทป์ชนิด *CC* มีผลต่อ ระดับของ tHcy ในพลาสมา⁽³²⁾

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลกระทบร่วม (combined effect) ระหว่าง *MTHFR* โพลีมอร์ฟิซึม *C677T* และ *A1298C* พบว่า *AA* homozygous ของ *A1298C* มีผลต่อการเพิ่ม ขึ้นของระดับ tHcy ในเลือดในผู้ที่ เป็น *T* carriers (*CT+TT*) แต่ไม่มีผลกระทบต่อผู้ที่ เป็น *CC* homozygous ของ *C677T* ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่ *T* allele ของ *C677T* ทำให้มีการ สร้าง thermolabile form ของ *MTHFR* และทำให้ activity ลดลง⁽¹⁷⁾ เมื่อร่วมกับการมีจีโนไทป์แบบ *1298AA* มีการ เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก กลูตาเมตไปเป็น อะลานีนที่ ตำแหน่ง 429 ของ *MTHFR* และมีผลต่อการทำหน้าที่ของ เอนไซม์⁽¹⁸⁾อาจมีผลส่งเสริมทำให้ความสามารถในการทำงาน

ของ thermolabile form ของ *MTHFR* ลดลงมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ native form (จีโนไทป์แบบ *677CC*) หรือแม้แต่ว่ากับกลุ่มที่มีจีโนไทป์แบบ *677 CT+TT* ร่วมกับ *1298 AC+CC*

โดยสรุปการศึกษานี้พบว่าที่สามารถสืบค้นได้เป็นการ ศึกษาครั้งแรกในคนไทยที่เป็นผู้ป่วย CAD ถึงแม้ผลการศึกษา จะไม่บ่งชี้ความสัมพันธ์โดยตรงระหว่าง *MTHFR* โพลีมอร์ ฟิซึมกับ CAD แต่พบความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการ เพิ่มขึ้นของระดับ tHcy ในเลือดซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ เกิด CAD

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการทุกท่าน เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง เลือดและการวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด และขอขอบคุณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุน ครุภัณฑ์อุปกรณ์ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย การ ศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากกลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [online] 2011 [cited 12 May 2012]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
2. ฉัตรปวีณ์ จัรัสรวาวัฒน์. ปัจจัยเสี่ยงและการป้องกัน โรคหัวใจขาดเลือด. วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์ สุขภาพ 2552; 16: 33-41.
3. Dhar S, Chatterjee S, Ray S, Dutta A, Sengupta B, Chakrabarti S. Polymorphisms of methylene-tetrahydrofolate reductase gene as the genetic predispositions of coronary artery diseases in eastern India. J Cardiovasc Dis Res 2010; 1: 152-7.
4. Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and

- meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 1203-12.
5. Roeters van Lennep JE, Westerveld HT, Erkelens DW, van der Wall EE. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 538-49.
6. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.
7. Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ. Genetics of hyperhomocysteinemia in cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 46-59.
8. Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, Nordhei AK. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998; 44: 311-6.
9. Willems FF, Aengevaeren WR, Boers GH, Blom HJ, Verheugt FW. Coronary endothelial function in hyperhomocysteinemia: improvement after treatment with folic acid and cobalamin in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 766-72.
10. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med* 1999; 246: 425-54.
11. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79.
12. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2649-56.
13. McDonald L, Bray C, Field C, Love F, Davies B. Homocystinuria, thrombosis and the blood platelets. *Lancet* 1964; 283: 745-6.
14. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NE, Tan LC, et al. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 146-53.
15. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-16.
16. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1327-33.
17. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
18. van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-51.
19. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and interaction with smoking and alcohol consumption in lung cancer risk: a case-control study in a Japanese population. *BMC Cancer* 2011; 11: 459.
20. Yoon KL, Ko JH, Shim KS, Han MY, Cha SH, Kim SK, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase are not a risk factor for Kawasaki disease in the Korean population. *Korean J Pediatr* 2011; 54: 335-9.
21. Pandey U, Kumari R, Nath B, Ganesh S, Banerjee I, Hasan OM, et al. Association of angiotensin-converting enzyme, methylene tetrahydrofolate reductase and paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in an Indian population. *Cardiol J* 2011; 18: 385-94.

22. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006; 131: 395-401.
23. Sameer AS, Shah ZA, Nissar S, Mudassar S, Siddiqi MA. Risk of colorectal cancer associated with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in the Kashmiri population. *Genet Mol Res* 2011; 10: 1200-10.
24. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Sura T, Aryuchai K, Busabaratanana M, Atichartakarn V. Prevalence of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation in Thai patients with deep vein thrombosis. *Acta Haematol* 2000; 103: 191-6.
25. Promthet SS, Pientong C, Ekalaksananan T, Wiangnon S, Poomphakwaen K, Songserm N, et al. Risk factors for colon cancer in northeastern Thailand: interaction of MTHFR codon 677 and 1298 genotypes with environmental factors. *J Epidemiol* 2010; 20: 329-38.
26. Abu-Amero KK, Wyngaard CA, Dzimir N. Prevalence and role of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T and 1298 A-->C polymorphisms in coronary artery disease in Arabs. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1349-52.
27. Guerzoni AR, Biselli PM, Godoy MF, Souza DR, Haddad R, Eberlin MN, et al. Homocysteine and MTHFR and VEGF gene polymorphisms: impact on coronary artery disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. [Research Support, Non-U.S. Gov't] 2009; 92: 249-5.
28. Tripathi R, Tewari S, Singh PK, Agarwal S. Association of homocysteine and methylene tetrahydrofolatereductase (MTHFR C677T) gene polymorphism with coronary artery disease (CAD) in the population of North India. *Genet Mol Biol* 2010; 33: 224-8.
29. Vijaya Lakshmi SV, Naushad SM, Rupasree Y, Seshagiri Rao D, Kutala VK. Interactions of 5'-UTR thymidylate synthase polymorphism with 677C --> T methylene tetrahydrofolatereductase and 66A --> G methyltetrahydrofolatehomocysteine methyl-transferasereductase polymorphisms determine susceptibility to coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18: 56-64.
30. Adam SK, Soelaiman IN, Umar NA, Mokhtar N, Mohamed N, Jaarin K. Effects of repeatedly heated palm oil on serum lipid profile, lipid peroxidation and homocysteine levels in a postmenopausal rat model. *Mcgill J Med* 2008; 11: 145-51.
31. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-8.
32. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999; 129: 1656-61.