

MT2A ยีนโพลิมอร์ฟิซึมและปัจจัยเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดในคนไทย สุขภาพดีที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

รุจิกรณ์ รัตนธรรมา^{1,2}, ณงนุช เศรษฐเสถียร^{2,3}, ชาทรี เศรษฐเสถียร^{2,4*}, ปรางธนา ยงสกุลชัย^{2,5},
อังกรัตน์ ศุภติไพบูลย์^{2,5}, นิสา เดชาราชกุล^{2,5}, ศศิธร ไชยัญญู^{1,2}

Received: June 25, 2014

Revised & Accepted: August 15, 2014

บทคัดย่อ

โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease; CVD) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญทั่วโลก โดยปัจจัยเสี่ยงต่อ CVD ได้แก่ การสูบบุหรี่ ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอ้วน และภาวะผิดปกติของไขมันในเลือด เป็นต้น คิวบินที่ประกอบด้วยสารเคมีอันตรายเป็นทั้งโลหะหนักเช่น แคดเมียม สามารถชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ เมทัลโลไธโอนีน (metallothionein; MT) เป็น metal binding protein ที่สำคัญในร่างกาย ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลและการขนส่งโลหะหนักที่เป็นพิษ เช่น สังกะสีและทองแดง รวมทั้งทำหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระและโลหะหนักที่เป็นพิษ เช่น แคดเมียม โปรตีนเมทัลโลไธโอนีน 2 เอ (MT2A) เป็นไอโซฟอร์มที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย การกลายพันธุ์ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน MT2A จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนหรือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 3'UTR จะมีผลต่อความเสถียรของ mRNA การแปลรหัสและตำแหน่งจำเพาะของโปรตีนภายในเซลล์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MT2A และปัจจัยเสี่ยงของ CVD ในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ โดยศึกษาในอาสาสมัครจำนวน 222 คน แบ่งเป็นกลุ่มไม่สูบบุหรี่ 157 คน กลุ่มเคยสูบบุหรี่ 17 คน และกลุ่มสูบบุหรี่ 48 คน ตรวจหา MT2A ยีนโพลิมอร์ฟิซึมตำแหน่ง -5A/G และ +838C/G ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และศึกษาความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ผลการศึกษาพบความถี่ของ minor allele ของ MT2A -5G ร้อยละ 2.7 และ MT2A +838C ร้อยละ 20.0 อีกทั้งพบความสัมพันธ์ระหว่าง MT2A -5A/G กับระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ในเลือดโดยผู้ที่มียีนไทป์ AG ในอาสาสมัครทั้งหมด กลุ่มไม่สูบบุหรี่และกลุ่มเคยสูบบุหรี่มีระดับ MDA สูงกว่าผู้ที่มียีนไทป์ AA ($P = 0.007$, $P = 0.011$ และ $P = 0.019$ ตามลำดับ) และยังพบอีกว่าผู้ที่มียีนไทป์ AG ในอาสาสมัครทั้งหมดและกลุ่มไม่สูบบุหรี่มีระดับ systolic blood pressure สูงกว่าผู้ที่มียีนไทป์ AA ($P = 0.003$ และ $P = 0.018$) ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดและกลุ่มไม่สูบบุหรี่ ผู้ที่มียีนไทป์ AG มีความชุกของความดันโลหิตสูง มากกว่าผู้ที่มียีนไทป์ AA ($P = 0.003$ และ $P = 0.019$) สำหรับ MT2A+838C/G นั้นกลุ่มผู้สูบบุหรี่ที่มียีนไทป์ GG มีสัดส่วนของผู้มีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ สูงกว่ากลุ่ม C carrier ($P = 0.040$) จากผลการศึกษาทั้งหมดกล่าวได้ว่ายีนโพลิมอร์ฟิซึมของ MT2A อาจสามารถนำมาใช้ในการประเมินความเสี่ยงต่อการมีภาวะเครียดออกซิเดชัน (บ่งชี้จากระดับ MDA ที่สูงขึ้น) ภาวะความดันโลหิตสูง และภาวะไขมันผิดปกติ ซึ่งภาวะดังกล่าวเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CVD

คำสำคัญ: การสูบบุหรี่, เมทัลโลไธโอนีน, โพลิมอร์ฟิซึม, มาลอนไดอัลดีไฮด์, ความดันโลหิตสูง, ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ

¹นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²กลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

The *MT2A* gene polymorphisms and risk factors for CVD in healthy Thais according to smoking status

Rujikorn Rattanatham^{1,2}, Nongnuch Settasatian^{2,3}, Chatri Settasatian^{2,4*}, Pratthana Yongsakulchai^{2,5},
Ingkarat Sarutipai boon^{2,5}, Nisa Decharatchakul^{2,5}, Sasitorn Khaichaiyaphum^{1,2}

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) represent the major global health problem. The CVD risk factors include smoking, hypertension, diabetes, obesity, and dyslipidemia. Cigarette smoke contains toxic substances and heavy metals such as cadmium that can induce body oxidative stress. Metallothionein (MT), an important metal binding protein, plays key roles in the homeostasis and transportation of essential heavy metals such as zinc and copper, scavenging of free radicals, and detoxifying of toxic heavy metal like cadmium. The most abundant MT isoform found in human tissues is *MT2A*. Mutations at core promoter region of *MT2A* gene can affect the gene expression. Moreover, mutations at 3'UTR affect mRNA stability, translation process and cellular localization. The aim of present study was to investigate the polymorphisms of *MT2A* gene and CVD risk factors in Thai smokers and never-smokers. The study was conducted in a total of 222 Thai individuals consisting of 157 never-smokers, 17 former-smokers, and 48 current-smokers. The *MT2A* -5A/G and +838C/G gene polymorphisms were investigated by PCR-RFLP technique. The respective minor allele frequencies of *MT2A*-5G and +838C were 2.7 and 20.0%. *MT2A*-5A/G gene polymorphism was related to serum malondialdehyde (MDA) level and hypertension. The MDA levels in all subjects, never-smokers, and former-smokers with AG genotype were significantly higher than in those with AA genotype. Systolic blood pressure (SBP) and the prevalence of hypertension were also significantly higher in all subjects and never-smokers with AG genotype than in those with AA genotype ($P = 0.003$ and $P = 0.019$ respectively). For the *MT2A* +838C/G, the prevalence of dyslipidemia in current-smokers with GG genotype was higher than in those with GC+CC genotype ($P = 0.040$). These findings suggest that *MT2A* gene polymorphism may have application on assessment for risk of oxidative stress, hypertension, and dyslipidemia; all of these are known as risk factors for CVD.

Keywords: Smoking, Metallothionein, Polymorphism, Malondialdehyde, Hypertension, Dyslipidemia

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

⁵Postgraduate Student in Biomedical Science, Graduate School, Khon Kaen University

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

บทนำ

โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases; CVDs) เป็นกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือด⁽¹⁾ สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการมีภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis)⁽¹⁾ อัตราการเสียชีวิตจาก CVDs พบบ่อยขึ้นในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา เช่น กลุ่มประเทศในเอเชีย⁽²⁾ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) พบว่า ในปี พ.ศ. 2554 อัตราการเสียชีวิตจาก CVDs ในคนไทย คือ 265 คนต่อประชากร 100,000 คน^(1, 3) ปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง ได้แก่ อายุ เพศ การขาดการออกกำลังกาย ความอ้วน ความดันโลหิตสูง การสูบบุหรี่ การรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) และปัจจัยทางด้านพันธุกรรม^(1, 4, 5)

WHO รายงานว่าร้อยละ 35 ถึง 40 ของผู้สูบบุหรี่เสียชีวิตด้วย CVD⁽⁵⁾ โดยการสูบบุหรี่ส่งผลทำให้เกิดภาวะผนังหลอดเลือดเสื่อมสภาพ (endothelial dysfunction) การอักเสบ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน ระบบไหลเวียนเลือดเกิดการเปลี่ยนแปลง (hemodynamic alterations) ระดับไขมันในเลือดผิดปกติและภาวะการแข็งตัวของเลือดมากผิดปกติ (hypercoagulable state)⁽⁶⁾ บุหรี่ประกอบไปด้วยสารเคมีที่เป็นพิษมากกว่า 5,000 ชนิด โดยมีสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิด CVD เช่น นิโคติน คาร์บอนมอนอกไซด์ ทาร์ และแควดเมียม เป็นต้น⁽⁷⁻⁹⁾

เมทัลโลไธโอนิน (MT) เป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (6-7 kDa) ที่มีสัดส่วนของกรดอะมิโนชนิด cysteine สูง (ประมาณร้อยละ 33) และด้วยหมู่ thiol (-SH) ที่อยู่ใน cysteine สามารถจับกับโลหะหนักได้ดี ดังนั้นหน้าที่หลักของ MT จึงเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลและการขนส่งโลหะหนักที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ (essential metal) เช่น สังกะสี และทองแดง และการกำจัดโลหะหนักที่เป็นพิษ เช่น ตะกั่วและแคดเมียม รวมทั้งการกำจัดสารอนุมูลอิสระ โปรตีน MT ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งในคนมี 4 ไอโซฟอร์ม (isoform) หลัก⁽¹⁰⁾ โดยไอโซฟอร์มที่มีการแสดงออกในทุกเซลล์ของร่างกาย (ubiquitously expressed) และพบมากในเซลล์ตับได้แก่ MT-1 และ MT-2⁽¹⁰⁾ ส่วนไอโซฟอร์ม MT-3 และ MT-4 พบมีการแสดงออกในเซลล์จำเพาะ เช่น MT-3 พบในเซลล์สมอง ตับอ่อนและลำไส้ ส่วน MT-4 พบใน stratified squamous epithelium cells⁽¹⁰⁾ การแสดงออกของ

โปรตีน MT เกิดจากการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น โลหะหนัก สารพิษ cytokines สารอนุมูลอิสระและการอักเสบ เป็นต้น^(11, 12) โปรตีน MT ถอดรหัสมาจาก MT gene family โดย MT-1 gene family ประกอบด้วย 7 ยีนที่แสดงออก (functional genes: MT-1A, 1B, 1E, 1F, 1G, 1H และ 1X) และ 6 ยีนเทียม (pseudogenes: MT-1C, 1D, 1I, 1J, 1K และ 1L) ส่วนโปรตีน MT-2, MT-3 และ MT-4 ถอดรหัสมาจากยีนเดี่ยวที่จำเพาะ คือ MT2A, MT3 และ MT4 ตามลำดับ⁽¹³⁾ มีรายงานการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของ MT2A ยีนโพลิมอร์ฟิซึมกับปัจจัยเสี่ยงต่อ CVD ซึ่งยีนโพลิมอร์ฟิซึมของ MT2A ที่สำคัญและมีความสนใจนำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ MT2A -5A/G (rs28366003) และ MT2A+838C/G (rs10636) โดยโพลิมอร์ฟิซึมชนิด MT2A -5A/G เป็นโพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดในตำแหน่งโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีน MT2A ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน⁽¹⁴⁾ มีรายงานการศึกษา functional study ในเซลล์เพาะเลี้ยง HEK293 พบว่าในกลุ่มที่มีอัลลีล G มีระดับการแสดงออกของ mRNA น้อยกว่ากลุ่มที่มีอัลลีล A⁽¹⁵⁾ อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าอาสาสมัครที่มีจีโนไทป์ GG ไวต่อการเกิดพิษจากโลหะหนักได้ง่ายกว่าอาสาสมัครที่มีจีโนไทป์ AA⁽¹⁶⁾ ส่วนยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด MT2A+838C/G เป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก guanine (G) เป็น cytosine (C) ที่ตำแหน่งใน 3' untranslated region (3'UTR) ซึ่งพบว่า มีผลต่อความเสถียรและการแปลรหัส (translation) ของ mRNA รวมทั้งการกำหนดตำแหน่งที่อยู่ (localization) ของ mRNA ซึ่งจะส่งผลต่อตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนภายในเซลล์ด้วย⁽¹⁷⁾ โดยพบว่าการทำหน้าที่ของโปรตีน MT ในการจับกับโลหะหนักขึ้นอยู่กับทั้งโครงสร้างของโปรตีนและตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนภายในเซลล์⁽¹⁸⁾ ซึ่งกระบวนการ post-transcription ที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลถึงความสามารถของโปรตีน MT ในการจับกับโลหะหนัก⁽¹⁹⁾

จากการที่ MT2A ยีนโพลิมอร์ฟิซึม มีผลกระทบต่อความสามารถในการควบคุมสมดุลโลหะหนักที่จำเป็นต่อเซลล์ และการกำจัดโลหะหนักที่เป็นพิษ รวมทั้งกำจัดสารอนุมูลอิสระโดยทั้งโลหะหนักที่เป็นพิษและสารอนุมูลอิสระล้วนเป็นผลกระทบจากการสูบบุหรี่และเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิด CVD รวมทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวในคนไทยมาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน MT2A และปัจจัยเสี่ยงของ

CVD ในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

วัสดุและวิธีการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยอาสาสมัครทุกรายได้รับการชี้แจงเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการวิจัยจากคณะผู้วิจัย เข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจและลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครทุกคนได้ตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับข้อมูลพื้นฐาน การตรวจประเมินร่างกายเบื้องต้นและตรวจสุขภาพร่างกายจากแพทย์

กลุ่มตัวอย่าง

เป็นอาสาสมัครสุขภาพดีที่อาศัยอยู่ในตำบลยางคำ อำเภอนองเรือ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 222 คน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่^(20, 21) ได้แก่ กลุ่มไม่สูบบุหรี่ (never-smokers) จำนวน 157 คน กลุ่มเคยสูบบุหรี่ (former-smokers) จำนวน 17 คน และกลุ่มสูบบุหรี่ (current-smokers) จำนวน 48 คน สำหรับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ อาสาสมัครผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่มาก่อนจะจัดอยู่ในกลุ่มไม่สูบบุหรี่ อาสาสมัครผู้ที่เคยสูบบุหรี่และได้เลิกสูบบุหรี่ไปแล้วในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาก็จัดอยู่ในกลุ่มเคยสูบบุหรี่ โดยพบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เคยสูบบุหรี่เป็นระยะเวลามากกว่า 15 ปี ก่อนเลิกสูบบุหรี่และมีระยะเวลาที่เลิกสูบบุหรี่เฉลี่ย 11 ปี โดยคนที่เลิกสูบบุหรี่เป็นเวลาน้อยที่สุดคือ 1 ปี ส่วนกลุ่มสูบบุหรี่คืออาสาสมัครที่ปัจจุบันรวมทั้งในช่วงเวลาที่ทำการศึกษายังคงสูบบุหรี่ โดยพบว่าอาสาสมัครทุกคนสูบบุหรี่เป็นประจำทุกวัน และส่วนใหญ่ (ร้อยละ 31.3) เป็นกลุ่มที่มีอัตราการสูบบุหรี่ 10-15 มวนต่อวัน ระยะเวลาที่สูบบุหรี่ของอาสาสมัครส่วนใหญ่ (ร้อยละ 63.6) มากกว่า 15 ปี

เกณฑ์การคัดเข้า⁽²²⁻²⁴⁾

เป็นผู้ที่ไม่มีประวัติการเป็นมะเร็งและไม่มีภาวะอักเสบ ซึ่งได้ข้อมูลจากการตรวจสุขภาพโดยแพทย์และการตอบแบบสอบถาม มีผลการตรวจระดับสารชีวเคมีในเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ ดังนี้ ระดับ blood urea nitrogen (BUN) < 19.1 mg/dL, creatinine (Cr) < 1.5 mg/dL, uric acid < 8.5 mg/dL, เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ≤ 50 U/L, aspartate aminotransferase (AST) ≤ 52 U/L และ alkaline phosphatase (ALP) < 147 U/L

การเก็บตัวอย่าง

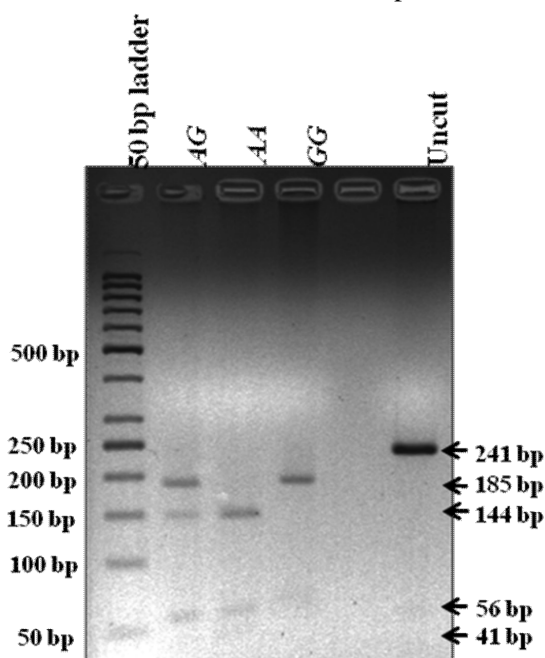
เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำของอาสาสมัครที่ทำการดื่มน้ำและอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง เก็บเลือดในหลอดเก็บที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ใช้สำหรับสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Flexi Gene DNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany) ส่วนซีรัมซึ่งเตรียมจากเลือดที่ไม่ได้ใส่สารกันเลือดแข็งใช้ในการตรวจระดับสารชีวเคมีต่างๆ ในเลือด การตรวจวัดระดับกลูโคสใช้เลือดที่มีโซเดียมฟูลออไรด์เป็นสารกันเลือดแข็ง ทำการตรวจวัดสารชีวเคมีต่างๆ ด้วยน้ำยาสำเร็จรูปและเครื่องวิเคราะห์หัตถ์อัตโนมัติ (Hitachi 912, Hitachi, Tokyo, Japan)

การตรวจหายีนโพลิมอร์ฟิซึมของ *MT2A*

ตรวจหายีนโพลิมอร์ฟิซึมของ *MT2A* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เครื่อง thermal cycler (Veriti, Life Technologies Corp, Carlsbad, CA) และส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 μ L

1) ยีนโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A*-5A/G ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย DNA ของกลุ่มตัวอย่าง 100 ng, dNTP 200 μ M (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Crop, CA), 1X PCR buffer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), primer แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1.0 μ M โดยใช้ forward และ reverse primers (Integrated DNA Technologies Inc, Singapore) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-CCT GGA GCC GCA AGT GAC TC-3' และ 5'-TGG GCA TCC CCA GCC TCT TA-3' ตามลำดับ^(14, 25, 26), Taq DNA polymerase 0.5 unit (Invitrogen) และ PCR enhancer (Invitrogen) ขั้นตอนการทำ PCR มีดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 57°C เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที สุดท้ายเป็น final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้นำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Bsg I* (New England Biolabs, New England Biolabs Ltd, Hitchin, UK) 1.5 unit (ปริมาตรรวม 20 μ L) ที่อุณหภูมิ 37°C 18 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบขนาด DNA ด้วยวิธี electrophoresis บน 3% agarose gel (รูปที่ 1) ซึ่งจีโนไทป์ AA ให้ผลผลิต DNA ขนาด 144, 56 และ 41 bp ส่วนจีโนไทป์ AG ให้ผลผลิต

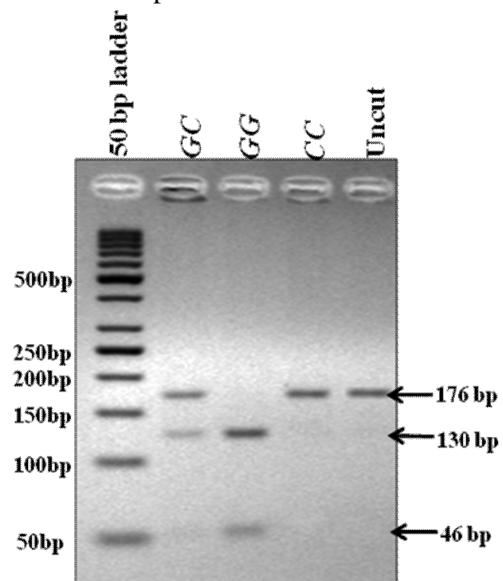
DNA ขนาด 185, 144, 56 และ 41 bp และจีโนไทป์ GG ให้ผลผลิต DNA ขนาด 185 และ 56 bp



รูปที่ 1 แสดงจีโนไทป์ของยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A-5A/G*: Lane 1 = AG genotype (185, 144, 56 และ 41 bp bands), lane 2 = AA genotype (144, 56 และ 41 bp bands), lane 3 = GG genotype (185 และ 56 bp bands), Uncut = undigested PCR product

2) ยีนโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A +838C/G* ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย DNA ของกลุ่มตัวอย่าง 100 ng, dNTP 200 μ M (Invitrogen), 1X PCR buffer (Invitrogen), 1.0 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), primer แต่ละชนิดความเข้มข้น 1.0 μ M โดยใช้ forward และ reverse primers (Integrated DNA Technologies) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Giacconi และคณะ⁽²⁷⁾ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-GAA CGC GAC TTC CAC AAA CC-3' และ 5'-TTC AAT CCC TCA CCC CAG TC-3' ตามลำดับ และ *Taq* DNA polymerase 0.5 unit (Invitrogen) โดยมีขั้นตอนการทำ PCR ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 54°C เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที สุดท้ายเป็น final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที โดยผลผลิต

PCR ที่ได้นำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Tsp45I* (New England Biolabs, New England Biolabs Ltd, Hitchin, UK) 1.0 unit (ปริมาตรรวม 20 μ L) ที่อุณหภูมิ 65°C 18 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบขนาด DNA ด้วย electrophoresis บน 3% agarose gel (รูปที่ 2) ซึ่งจีโนไทป์ GG ให้ผลผลิต DNA ขนาด 130 และ 46 bp จีโนไทป์ GC ให้ผลผลิต DNA ขนาด 176, 130 และ 46 bp ส่วนจีโนไทป์ CC ให้ผลผลิต DNA ขนาด 176 bp



รูปที่ 2 แสดงจีโนไทป์ของยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A+838C/G*: Lane 1 = GC genotype (176, 130 และ 46 bp bands), lane 2 = GG genotype (130 และ 46 bp bands), lane 3 = CC genotype (176 bp band), Uncut = undigested PCR product

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17.0 การกระจายตัวของจีโนไทป์เป็นไปตามกฎ Hardy-Weinberg equilibrium การทดสอบการกระจายของข้อมูลใช้ Kolmogorov-Smirnov test การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลซึ่งเป็นค่าต่อเนื่องระหว่างสองกลุ่มใช้ Student's *t*-test และมากกว่าสองกลุ่มใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มสำหรับข้อมูลเชิงกลุ่มใช้ Chi-square test และค่า *P*-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

จากอาสาสมัครทั้งหมด 222 คน นำมาศึกษาเปรียบเทียบระดับสารชีวเคมีในเลือดรวมทั้งตัวแปรทางคลินิกระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่ เคยสูบบุหรี่ และสูบบุหรี่ ดังแสดงใน **ตารางที่ 1** พบว่า สัดส่วนของเพศชายต่อเพศหญิงมีความแตกต่างกันระหว่างสามกลุ่มการศึกษา ($P < 0.001$) ระดับ body mass index (BMI) ขนาครอบเอวและรอบสะโพก ในกลุ่มสูบบุหรี่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งพบว่าจำนวนผู้ที่มีการอ้วน (obesity) ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) ในกลุ่มสูบบุหรี่มีน้อยกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.001$) การตรวจวัดระดับคาร์บอนมอนอกไซด์จากลมหายใจ (breath carbon monoxide; BCO) และเปอร์เซ็นต์คาร์บอกซีฮีโมโกลบิน (% carboxyhemoglobin; %COHb) พบว่าในกลุ่มสูบบุหรี่มีค่าสูงกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่ ($P < 0.001$)

นอกจากนี้พบว่า ระดับ BUN, Cr และ uric acid มีความแตกต่างกันทั้งสามกลุ่ม ($P < 0.001$) สำหรับค่า total cholesterol (TC) และ low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ในกลุ่มสูบบุหรี่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.008$ และ $P = 0.010$ ตามลำดับ) แต่กลับพบว่าระดับ triglyceride (TG) มีแนวโน้มสูงขึ้นและระดับ high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) มีแนวโน้มต่ำลงในกลุ่มสูบบุหรี่ ในกลุ่มสูบบุหรี่พบว่าระดับเอนไซม์ AST, ALT และ ALP สูงกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.010$, $P = 0.006$ และ $P = 0.034$ ตามลำดับ) นอกจากนี้พบว่ากลุ่มสูบบุหรี่มี % monocyte สูงกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.008$) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของ WBC count, % neutrophil และ % lymphocyte

ตารางที่ 1 แสดงพารามิเตอร์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่ กลุ่มเคยสูบบุหรี่ และกลุ่มสูบบุหรี่ แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD

Parameters	All subjects (n = 222)	Never-smokers (n = 157)	Former-smokers (n = 17)	Current-smokers (n = 48)	P -value
Gender:					
Male,% (n)	36.5 (81)	11.5 (18)	100 (17)	95.8 (46)	< 0.001
Female, % (n)	63.5 (141)	88.5 (139)	0.0 (0)	4.2 (2)	
Age (years)	48.6 $\pm$ 8.9	48.0 $\pm$ 9.4	51.9 $\pm$ 5.4	49.3 $\pm$ 7.8	0.177
BMI (kg/m ²)	24.2 $\pm$ 4.1	24.8 $\pm$ 4.3	23.9 $\pm$ 4.0	22.2 $\pm$ 2.4	< 0.001
SBP (mmHg)	122.1 $\pm$ 14.6	121.9 $\pm$ 14.9	124.1 $\pm$ 13.9	121.9 $\pm$ 14.0	0.840
DBP (mmHg)	76.3 $\pm$ 11.2	76.7 $\pm$ 12.1	77.7 $\pm$ 10.0	74.7 $\pm$ 8.2	0.492
Waist (cm)	82.1 $\pm$ 10.4	83.3 $\pm$ 10.6	83.5 $\pm$ 9.5	77.5 $\pm$ 8.4	0.002
Hip (cm)	95.0 $\pm$ 7.3	96.0 $\pm$ 7.6	95.1 $\pm$ 5.8	91.4 $\pm$ 5.5	< 0.001
Waist/hip ratio	0.86 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.07	0.88 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.06	0.179
BCO (ppm)	2.10 $\pm$ 2.72	1.27 $\pm$ 1.14	1.65 $\pm$ 2.06	4.94 $\pm$ 4.28	< 0.001
%COHb	0.82 $\pm$ 0.61	0.66 $\pm$ 0.45	0.69 $\pm$ 0.59	1.39 $\pm$ 0.75	< 0.001
Glucose (mg/dL)	89.6 $\pm$ 22.4	90.7 $\pm$ 26.0	86.9 $\pm$ 5.6	87.0 $\pm$ 9.1	0.741
BUN (mg/dL)	11.4 $\pm$ 2.8	10.9 $\pm$ 2.6	13.5 $\pm$ 2.9	12.3 $\pm$ 2.8	< 0.001
Creatinine (mg/dL)	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	< 0.001

ตารางที่ 1 แสดงพารามิเตอร์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่ กลุ่มเคยสูบบุหรี่ และกลุ่มส ุบบุหรี่ แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (ต่อ)

Parameters	All subjects	Never-smokers	Former-smokers	Current-smokers	P -value
	(n = 222)	(n = 157)	(n = 17)	(n = 48)	
Uric acid (mg/dL)	5.0 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 1.2	< 0.001
TC (mg/dL)	188.4 $\pm$ 34.7	192.6 $\pm$ 34.8	187.9 $\pm$ 34.8	175.0 $\pm$ 31.6	0.008
TG (mg/dL)	143.6 $\pm$ 90.4	140.0 $\pm$ 92.7	147.4 $\pm$ 100.4	153.8 $\pm$ 79.8	0.642
HDL-C (mg/dL)	45.1 $\pm$ 10.8	46.1 $\pm$ 11.0	44.0 $\pm$ 9.8	42.3 $\pm$ 9.9	0.076
LDL-C (mg/dL)	115.6 $\pm$ 32.6	119.3 $\pm$ 32.1	117.9 $\pm$ 36.9	103.1 $\pm$ 30.1	0.010
TC/HDL-C ratio	4.4 $\pm$ 1.2	4.4 $\pm$ 1.2	4.5 $\pm$ 1.3	4.3 $\pm$ 1.2	0.895
TG/HDL-C ratio	3.6 $\pm$ 3.2	3.5 $\pm$ 3.2	3.9 $\pm$ 4.0	4.0 $\pm$ 2.7	0.520
LDL-C/HDL-C ratio	2.7 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.9	0.669
AST (mg/dL)	27.5 $\pm$ 7.5	26.5 $\pm$ 7.2	29.7 $\pm$ 7.2	30.0 $\pm$ 8.2	0.010
ALT (mg/dL)	23.2 $\pm$ 9.9	22.0 $\pm$ 9.8	26.9 $\pm$ 9.7	26.0 $\pm$ 9.8	0.006
ALP (mg/dL)	72.2 $\pm$ 19.3	70.5 $\pm$ 20.2	70.4 $\pm$ 15.9	78.6 $\pm$ 15.6	0.034
WBC (x10 ⁹ /L)	7.1 $\pm$ 1.8	7.0 $\pm$ 1.8	7.2 $\pm$ 1.8	7.1 $\pm$ 1.5	0.965
Nutrophil (%)	51.8 $\pm$ 8.8	51.7 $\pm$ 8.8	52.8 $\pm$ 8.8	51.8 $\pm$ 8.9	0.902
Lymphocyte (%)	35.4 $\pm$ 7.5	36.0 $\pm$ 7.3	33.2 $\pm$ 7.2	34.1 $\pm$ 8.1	0.153
Monocyte (%)	6.4 $\pm$ 2.3	6.0 $\pm$ 1.7	7.1 $\pm$ 1.8	7.4 $\pm$ 3.5	0.001
hs-CRP (mg/L)	1.54 $\pm$ 1.89	1.70 $\pm$ 1.98	1.51 $\pm$ 2.03	0.99 $\pm$ 1.41	0.109
UrineCd (μ g/g Cr)	0.40 $\pm$ 0.72	0.37 $\pm$ 0.70	0.31 $\pm$ 0.57	0.52 $\pm$ 0.82	0.443
MDA (μ mol/L)	4.7 $\pm$ 1.4	4.6 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 1.7	0.235
Hypertension, %(n)	10.4 (23)	10.8 (17)	11.8 (2)	8.3 (4)	0.755
DM, %(n)	4.1 (9)	5.1 (8)	0.0 (0)	2.1 (1)	0.441
Dyslipidemia, %(n)	85.6 (190)	87.9 (138)	82.4 (14)	79.2 (38)	0.297
Obesity, %(n)	35.6 (79)	43.3 (68)	23.5 (4)	14.6 (7)	0.001

เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆระหว่างกลุ่มโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA); ข้อมูลเชิงกลุ่มเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้ Chi-square test

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของ *MT2A* ยีน เปรียบเทียบระหว่างสามกลุ่มตัวอย่างซึ่งเป็นไปตามกฎ Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) ผลการศึกษาในโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A*-5A/G พบว่าอัลลีล *A* เป็น major allele (ร้อยละ 97.3) และอัลลีล *G* เป็น minor allele (ร้อยละ 2.7) ซึ่งในกลุ่มอาสาสมัครที่ศึกษาครั้งนี้

ไม่พบผู้ที่มีจีโนไทป์ของ *MT2A*-5A/G แบบ *GG* สำหรับโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A* +838C/G พบอัลลีล *G* เป็น major allele (ร้อยละ 80.0) และอัลลีล *C* เป็น minor allele (ร้อยละ 20.0) โดยพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบคือ *GG*, *GC*, และ *CC* ในอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่ม

ตารางที่ 2 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของยีน *MT2A* (*MT2A*-5A/G และ *MT2A*+838C/G) ในกลุ่มตัวอย่าง เปรียบเทียบการกระจายจีโนไทป์และความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่มใช้ Chi-square test

<i>MT2A</i> gene polymorphism	All subjects	Never-smokers	Former-smokers	Current-smokers	<i>P</i> - value
<i>MT2A</i>-5A/G polymorphism (rs28366003)					
Genotype frequency	n = 222	n = 157	n = 17	n = 48	
<i>AA</i> ,%(n)	94.6 (210)	94.3 (148)	88.2 (15)	97.9 (47)	0.299
<i>AG</i> ,%(n)	5.4 (12)	5.7 (9)	11.8 (2)	2.1 (1)	
Allele frequency	n = 444	n = 314	n = 34	n = 96	
<i>A</i> ,%(n)	97.3 (432)	97.1 (305)	94.1 (32)	99.0 (95)	0.309
<i>G</i> ,%(n)	2.7 (12)	2.9 (9)	5.9 (2)	1.0 (1)	
<i>MT2A</i>+838C/G polymorphism (rs10636)					
Genotype frequency	n = 222	n = 157	n = 17	n = 48	
<i>GG</i> ,%(n)	64.9 (144)	62.4 (98)	58.8 (10)	75.0 (36)	
<i>GC</i> ,%(n)	30.2 (67)	31.2 (49)	41.2 (7)	22.9 (11)	0.303
<i>CC</i> ,%(n)	5.0 (11)	6.4 (10)	0.0 (0)	2.1 (1)	
Allele frequency	n = 444	n = 314	n = 34	n = 96	
<i>G</i> ,%(n)	80.0 (355)	78.0 (245)	79.4 (27)	86.5 (83)	0.195
<i>C</i> ,%(n)	20.0 (89)	22.0 (69)	20.6 (7)	13.5 (13)	

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A* -5A/G กับระดับ MDA และภาวะความดันโลหิตสูง (ตารางที่ 3) พบว่ากลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด และกลุ่มไม่สูบบุหรี่ที่มีจีโนไทป์ชนิด *AG* มีระดับ MDA สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด *AA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.007$ และ $P = 0.011$) อีกทั้งยังพบความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A* -5A/G กับระดับ systolic blood pressure (SBP) และอัตราการพบภาวะความดันโลหิตสูง โดยผู้ที่มี

จีโนไทป์ชนิด *AG* ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดและกลุ่มไม่สูบบุหรี่มีระดับ SBP สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด *AA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$ และ $P = 0.018$ ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการพบภาวะความดันโลหิตสูงในผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด *AG* มากกว่า *AA* ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด ($P = 0.014$) อีกทั้งเมื่อเลือกเปรียบเทียบความถี่ของจีโนไทป์เฉพาะในกลุ่มผู้ที่มีความดันอยู่ในช่วงปกติ (Optimal BP: SBP < 120 mmHg และ DBP < 80 mmHg) กับผู้ที่มี

ความดันในช่วงความดันโลหิตสูง (SBP $\geq$ 140 mmHg หรือ DBP $\geq$ 90 mmHg) พบว่าในกลุ่มจีโนไทป์ AG มีสัดส่วนผู้ที่มีความดันโลหิตสูงมากกว่ากลุ่มจีโนไทป์ AA ทั้งในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและกลุ่มไม่สูบบุหรี่ ($P = 0.003$ และ $P = 0.019$) (ตารางที่ 4) สำหรับกลุ่มเคยสูบบุหรี่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีจำนวนน้อย 17 คนไม่สามารถนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางสถิติได้ โดยพบว่ากลุ่มจีโนไทป์ AG ($n = 2$) มีค่า MDA 5.8 และ 7.7 $\mu\text{mol/L}$ ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มจีโนไทป์ AA ($n = 15$) ที่มีค่าเฉลี่ย MDA 4.6 ± 1.1 $\mu\text{mol/L}$ สำหรับค่า SBP พบว่าในกลุ่มจีโนไทป์ AG ($n =$

2) มีค่า SBP เท่ากับ 121 และ 151 mmHg และในกลุ่มจีโนไทป์ AA มีค่า SBP เฉลี่ย 122.5 ± 12.9 mmHg สำหรับกลุ่มสูบบุหรี่ เนื่องจากอาสาสมัครที่มีจีโนไทป์ AG มีเพียงรายเดียว ทำให้ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางสถิติได้ โดยพบว่าระดับ MDA ในอาสาสมัครจีโนไทป์ AA ($n = 47$) มีค่าเฉลี่ย MDA 4.9 ± 1.7 $\mu\text{mol/L}$ และกลุ่มจีโนไทป์ AG พบว่ามีค่า MDA 3.7 $\mu\text{mol/L}$ สำหรับค่า SBP ในกลุ่มจีโนไทป์ AA มีค่า SBP เฉลี่ย 121.6 ± 14.0 mmHg ส่วนกลุ่มจีโนไทป์ AG พบว่ามีค่า SBP 137.0 mmHg

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง MT2A -5A/G จีโนไทป์ AA และ AG กับระดับ MDA และค่าความดันโลหิตในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

Parameter	All subjects (n = 222)		P - value	Never-smokers (n = 157)		P - value
	AA	AG		AA	AG	
	n = 210	n = 12		n = 148	n = 9	
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	4.6 ± 1.3	5.8 ± 2.1	0.007	4.5 ± 1.2	5.8 ± 2.2	0.011
SBP (mmHg)	121.4 ± 14.1	134.0 ± 18.0	0.003	121.2 ± 14.4	133.2 ± 19.7	0.018
DBP (mmHg)	76.1 ± 11.1	79.8 ± 13.1	0.262	76.6 ± 12.0	77.7 ± 13.6	0.797
Hypertension, %(n)	9.0 (19)	33.3 (4)	0.014	9.5 (14)	33.3 (3)	0.063
Parameter	Former-smokers (n = 17)		P - value	Current-smokers (n = 48)		P - value
	AA	AG		AA	AG	
	n = 15	n = 2		n = 47	n = 1	
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	4.5 ± 1.1	5.8, 7.7	Not applicable	4.9 ± 1.7	3.7	Not applicable
SBP (mmHg)	122.5 ± 12.9	121.0, 151.0		121.6 ± 14.0	137.0	
DBP (mmHg)	76.7 ± 9.6	74.0, 95.0		74.3 ± 8.0	90.0	
Hypertension, % (n)	6.7 (1)	50.0 (1)		8.5 (4)	0.0	

เปรียบเทียบพารามิเตอร์ระหว่างจีโนไทป์ AA และ AG ด้วยสถิติ Student's *t*-test;

การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มสำหรับข้อมูลเชิงกลุ่มใช้ Chi-square test

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *MT2A* -5A/G กับภาวะความดันโลหิต ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบและไม่สูบบุหรี่

Blood pressure	<i>MT2A</i> -5A/G polymorphism		P - value
	AA genotype % (n)	AG genotype % (n)	
All subjects (n = 118)*	n = 112	n = 6	0.003
Optimal BP	83.0 (93)	33.3 (2)	
Hypertension	17.0 (19)	66.7 (4)	
Never-smokers (n = 87)*	n = 82	n = 5	0.019
Optimal BP	82.9 (68)	40.0 (2)	
Hypertension	17.1 (14)	60.0 (3)	

* เลือกเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มผู้ที่มีความดันโลหิตอยู่ในช่วง Optimal BP คือ SBP < 120 mmHg และ DBP < 80 mmHg กับกลุ่มผู้ที่มีความดันโลหิตอยู่ในช่วง hypertension คือ SBP ≥ 140 mmHg หรือ DBP ≥ 90 mmHg โดยตัดอาสาสมัครที่มีความดันโลหิตอยู่ในช่วง pre-hypertension: SBP 120-139 mmHg หรือ DBP 80-89 mmHg ออก; เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มจีโนไทป์ชนิด AA และ AG โดยใช้ Chi-square test

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A* +838C/G กับระดับ MDA, SBP หรือระดับสารชีวเคมีที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อ CVD ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมกับภาวะความดันโลหิตสูง แต่เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโพลิมอร์ฟิซึมกับ ภาวะไขมันในเลือด โดยการจัดกลุ่มตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่ กลับพบความสัมพันธ์ระหว่าง *MT2A* +838C/G กับภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia)⁽²⁸⁾ (ตารางที่ 5) เนื่องจากในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาพบความชุกของจีโนไทป์ชนิด homozygous CC ต่ำ ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มจีโนไทป์ชนิด GG กับกลุ่มจีโนไทป์ที่เป็น C carriers (GC+CC) พบว่าในกลุ่มสูบบุหรี่มีอัตราการพบภาวะไขมันในเลือดผิดปกติในผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด GG สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด GC+CC อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.040$)

การศึกษาในผู้ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติ เมื่อแยกกลุ่มตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่เพียงอย่างเดียวพบว่า อัตราการพบผู้ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6) และเมื่อศึกษาผลกระทบของ *MT2A* โพลิมอร์ฟิซึม ร่วมกับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ ต่อภาวะความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติ พบว่าทั้งโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* -5A/G และ *MT2A* +838C/G มีอัตราการพบภาวะความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติ ในแต่ละจีโนไทป์ไม่แตกต่างกัน (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A +838C/G* กับภาวะไขมันในเลือดในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

Lipidemia	<i>MT2A +838C/G</i> polymorphism		P-value
	<i>GG</i> genotype % (n)	<i>GC+CC</i> genotype % (n)	
All subjects (n = 222)	n = 144	n = 78	
Normolipidemia	13.2 (19)	16.7 (13)	0.482
Dyslipidemia	86.8 (125)	83.3 (65)	
Never-smokers (n = 157)	n = 98	n = 59	
Normolipidemia	11.2 (11)	13.6 (8)	0.664
Dyslipidemia	88.8 (87)	86.4 (51)	
Former-smokers (n = 17)	n = 10	n = 7	
Normolipidemia	30.0 (3)	0.0 (0)	0.110
Dyslipidemia	70.0 (7)	100.0 (7)	
Current-smokers (n = 48)	n = 36	n = 12	
Normolipidemia	13.9 (5)	41.7 (5)	0.040
Dyslipidemia	86.1 (31)	58.3 (7)	

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ: มีระดับไขมันอย่างน้อยชนิดใดชนิดหนึ่งผิดปกติ ดังนี้ 1) TC $\geq$ 200 mg/dL 2) TG $\geq$ 150 mg/dL 3) LDL-C $>$ 100 mg/dL หรือ 4) HDL-C $<$ 40 mg/dL ในผู้ชาย และ HDL-C $<$ 50 mg/dL ในผู้หญิง⁽²⁸⁾; การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *MT2A + 838* จีโนไทป์ *GG* และ *GC+CC* ใช้ Chi-square analysis

ตารางที่ 6 ความถี่ของผู้ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงและภาวะไขมันผิดปกติ โดยแบ่งกลุ่มตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่

Risk factors for CVD	Smoking status				P - value
	Never-smoker, % (n)	Former-smoker, % (n)	Current-smoker, % (n)	All subjects, %(n)	
	n = 157	n = 17	n = 48	n = 222	
Normal	11.5 (18)	17.6 (3)	18.8 (9)	13.5 (30)	
Dyslipidemia	77.7 (122)	70.6 (12)	72.9 (35)	76.1 (169)	
Hypertension	0.6 (1)	0.0 (0)	2.1 (1)	0.9 (2)	0.732
Hypertension and Dyslipidemia	10.2 (16)	11.8 (2)	6.3 (3)	9.5 (21)	

ภาวะความดันโลหิตสูง (hypertension) คือ SBP $\geq$ 140 mmHg หรือ DBP $\geq$ 90 mmHg, ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) มีระดับไขมันอย่างน้อยชนิดใดชนิดหนึ่งผิดปกติ ดังนี้ 1) TC $\geq$ 200 mg/dL 2) TG $\geq$ 150 mg/dL 3) LDL-C $>$ 100 mg/dL หรือ 4) HDL-C $<$ 40 mg/dL ในผู้ชาย และ HDL-C $<$ 50 mg/dL ในผู้หญิง⁽²⁸⁾, ข้อมูลเชิงกลุ่มเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้ Chi-square test; ค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

กระบวนการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งใน CVD มีความซับซ้อนและสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงสำคัญหลายอย่างที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ การสูบบุหรี่ ภาวะเครียดออกซิเดชัน รวมทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมที่เป็นตัวแปรในการเพิ่มหรือลดโอกาสของการเกิดโรค (genetic susceptibility) การสูบบุหรี่ถือว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิด CVD โดยการสูบบุหรี่สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและก่อให้เกิดภาวะอักเสบกับร่างกายทั้งระบบแบบเรื้อรังที่ไม่แสดงอาการ (asymptomatic chronic systemic inflammation)^(29,30) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้พบว่า % monocyte ในกลุ่มสูบบุหรี่สูงกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญในขณะที่ทั้ง % neutrophil และ % lymphocyte ไม่มีความแตกต่างโดยภาวะดังกล่าวเป็นกลไกสำคัญที่กระตุ้นกระบวนการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง

สำหรับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ ในกลุ่มสูบบุหรี่พบว่าส่วนใหญ่ (ร้อยละ 31.3) เป็นกลุ่มที่มีอัตราการสูบบุหรี่ 10-15 มวนต่อวัน ระยะเวลาที่สูบบุหรี่ของอาสาสมัครส่วนใหญ่ (ร้อยละ 63.6) มากกว่า 15 ปี ส่วนกลุ่มเคยสูบบุหรี่พบว่าส่วนใหญ่เป็นผู้ที่สูบบุหรี่มาเป็นเวลานาน (มากกว่า 15 ปี) ก่อนเลิกสูบบุหรี่และเลิกสูบบุหรี่มาเป็นเวลานานเช่นกัน (เฉลี่ย 11 ปี) โดยคนที่เลิกสูบบุหรี่เป็นเวลาน้อยที่สุดคือ 1 ปี จากการศึกษาของ Minami J และคณะ⁽³¹⁾ ได้ศึกษาในคนสูบบุหรี่มาเป็นเวลานาน (13.9 ± 1.1 ปี) เมื่องดสูบบุหรี่เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าระดับ SBP, DBP, heart rate, serum nicotine, serum cotinine, norepinephrine, epinephrine ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *MT2A* และปัจจัยเสี่ยงต่อ CVD ในคนไทย โดยแบ่งตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่ พบว่าระดับ BMI ไขมันรอบเอว รอบสะโพก ระดับ TC, LDL-C และจำนวนผู้ที่มีความดันโลหิตสูงในอาสาสมัครกลุ่มสูบบุหรี่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะที่สารนิโคตินในบุหรี่มีฤทธิ์เพิ่มอัตราการเผาผลาญพลังงานของร่างกาย รวมทั้งลดความอยากอาหารของผู้สูบบุหรี่ จึงส่งผลให้พารามิเตอร์ต่างๆดังกล่าวลดลงเมื่อเทียบกับผู้ไม่สูบบุหรี่⁽³²⁾ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mackay และคณะ⁽³³⁾ ซึ่งพบว่าคนสูบบุหรี่มีน้ำหนักร่างกาย หรือ BMI ต่ำกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ การสูบบุหรี่

มีผลกระทบต่อการทำงานของตับ⁽³⁴⁾ ซึ่งการศึกษานี้พบว่าระดับเอนไซม์ AST, ALT และ ALP ของกลุ่มสูบบุหรี่มีค่าสูงกว่ากลุ่มไม่สูบบุหรี่ มีรายงานพบว่าระดับเอนไซม์จากตับเพิ่มสูงขึ้นมากในกลุ่มคนสูบบุหรี่ร่วมกับการดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณมาก⁽³⁴⁻³⁷⁾

ความหลากหลายทางพันธุกรรมก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้แต่ละบุคคลมีความเสี่ยงต่อการเกิด CVD ที่แตกต่างกัน สำหรับโพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน เช่น ตำแหน่ง -5 ของ *MT2A* ยีน พบว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีนมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ เนื่องจากเป็นตำแหน่งสำคัญที่มีผลรบกวนหรือทำให้ regulatory factors ไม่สามารถเข้ามากระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน MT ได้⁽²⁶⁾ การศึกษาโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A*-5A/G ในคนไทยครั้งนี้พบการกระจายตัวของจีโนไทป์ชนิด AA ร้อยละ 94.6 และ AG ร้อยละ 5.4 โดยไม่พบจีโนไทป์ชนิด GG ส่วนความถี่อัลลีล A และ G คือ ร้อยละ 97.3 และร้อยละ 2.7 ตามลำดับ ซึ่งความถี่อัลลีลใกล้เคียงกับที่มีการศึกษาในเชื้อชาติอื่น เช่น ชาวญี่ปุ่น⁽¹⁴⁾ การกระจายตัวจีโนไทป์ชนิด AA, AG และ GG คือ ร้อยละ 82.4, 16.8 และ 0.9 โดยมีความถี่อัลลีล A และ G คือ ร้อยละ 90.8 และ 9.2 สำหรับชาวตุรกี⁽³⁸⁾ การกระจายตัวจีโนไทป์ชนิด AA, AG และ GG คือ ร้อยละ 87, 12.3 และ 0.7 ความถี่อัลลีล A และ G คือ ร้อยละ 93.0 และ 7.0 ในชาวโปรแลนด์⁽³⁹⁾ ความถี่อัลลีล A และ G คือ ร้อยละ 96.0 และ 4.0 สำหรับชาวแอฟริกัน จากที่มีรายงานพบความถี่อัลลีล A ร้อยละ 100⁽⁴⁰⁾

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* -5A/G กับระดับ MDA เป็นการบ่งบอกความสัมพันธ์กับภาวะเครียดออกซิเดชัน โดย MDA เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยสารอนุมูลอิสระ⁽⁴¹⁾ ถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชัน พบว่ากลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดและกลุ่มไม่สูบบุหรี่ที่มีจีโนไทป์ชนิด AG มีระดับ MDA สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ AA อาจสามารถบ่งชี้ได้ว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด AG มีการแสดงออกของยีน *MT2A* ได้น้อยกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ AA⁽¹⁴⁾ ทำให้ความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระโดยโปรตีน MT ของผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด AG ได้น้อยกว่า⁽⁴²⁾ จึงทำให้ยังคงมีสารอนุมูลอิสระสะสมในร่างกายมากกว่า และทำให้มีผลผลิตของ MDA สูงกว่า

ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* -5A/G กับภาวะความดันโลหิตสูง พบว่าในกลุ่มอาสา

สมัครทั้งหมดและกลุ่มไม่สูบบุหรี่ที่มีจีโนไทป์ *AG* มีค่าความดัน SBP เฉลี่ยสูงกว่า รวมทั้งมีจำนวนคนที่มีความดันโลหิตสูงมากกว่าผู้มีจีโนไทป์ชนิด *AA* โดยโพลิมอร์ฟิซึมดังกล่าวมีผลต่อการแสดงออกของยีน⁽¹⁴⁾ ดังนั้นจึงมีผลต่อระดับโปรตีน MT ที่มีหน้าที่หลักในการควบคุมสมดุลและขนส่งโลหะหนักที่เป็นในเซลล์ เช่น สังกะสี และทองแดง⁽⁴³⁾ ซึ่งเป็นโลหะหนักที่มีความสำคัญในการควบคุมความดันโลหิต⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ เนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เปลี่ยนแปลงไปเกิดภาวะ endothelial dysfunction ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงในที่สุด การพบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ *AG* ของ *MT2A* -5A/G กับทั้งระดับ MDA และภาวะความดันโลหิตสูงจึงเป็นการยืนยันผลกระทบของจีโนไทป์ *AG* ต่อความเสี่ยงการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและความดันโลหิตสูงซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของ CVD

สำหรับโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* +838C/G ในคนไทยพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ *GG*, *GC* และ *CC* คือ ร้อยละ 64.9, 30.2 และ 5.0 ตามลำดับ และความถี่อัลลีล *G* และ *C* คือ ร้อยละ 80 และ 20 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* +838C/G กับภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โดยในกลุ่มสูบบุหรี่ที่มีจีโนไทป์ชนิด *GG* มีจำนวนผู้ที่ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติสูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ *GC*+*CC* ซึ่งจากการศึกษาของ Yang และคณะ⁽⁴⁷⁾ พบว่าโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* +838C/G มีผลทำให้การใช้ประโยชน์จากกรดไขมันลดน้อยลง ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากการมีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงและมีภาวะไขมันในเลือดสูง⁽⁴⁷⁾ นอกจากนี้การศึกษาของ Giacconi และคณะ⁽²⁷⁾ ซึ่งศึกษาในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองคาโรติด (carotid artery stenosis) พบว่าในผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด *GG* มีอุบัติการณ์การเกิด vulnerable soft plaques สูงกว่าเมื่อเทียบกับผู้ที่มีอัลลีล *C* (*C* carrier) บ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด *GG* อาจเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดสมองได้สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอัลลีล *C*⁽²⁷⁾

จากผลการศึกษาครั้งนี้เมื่อแยกกลุ่มตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่เพียงอย่างเดียวพบว่า อัตราการพบผู้ที่มีความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติไม่แตกต่างกัน และเมื่อศึกษาผลของโพลิมอร์ฟิซึมร่วมกับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ อัตราการพบผู้ที่มีความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติก็ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อแยกเอาเฉพาะอาสาสมัครที่มีความดันโลหิตสูงร่วมกับภาวะไขมันผิดปกติ ทำให้จำนวนอาสาสมัครน้อยลงซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทางสถิติ ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรที่มากขึ้นอาจให้ผลลัพธ์ที่ชัดเจนขึ้นต่อผลกระทบดังกล่าว

จากผลการศึกษาครั้งนี้ เบื้องต้นพบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ชนิดต่างๆ ของโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* -5A/G และ *MT2A* +838C/G ในคนไทยนั้นยังสามารถพบได้ทั้ง major และ minor allele ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลหรือเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้นได้ อีกทั้งในหลายการศึกษาซึ่งพบความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึม *MT2A* -5A/G และ *MT2A* +838C/G กับปัจจัยเสี่ยงต่อ CVD เช่น มีภาวะไขมันในเลือดสูง⁽⁴⁷⁾ การควบคุมสมดุลโลหะหนักและความดันโลหิต⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ เป็นต้น ซึ่งกล่าวได้ว่าโพลิมอร์ฟิซึมของ *MT2A* อาจสามารถนำมาใช้ในการประเมินความเสี่ยงต่อการมีภาวะเครียดออกซิเดชัน (บ่งชี้จากระดับ MDA ที่สูงขึ้น) ภาวะความดันโลหิตสูง และภาวะไขมันผิดปกติ ซึ่งภาวะดังกล่าวเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CVD

ข้อจำกัด

เนื่องจากจำนวนตัวอย่างของการศึกษานี้ยังมีไม่มากพอ อีกทั้งสัดส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายในกลุ่มไม่สูบบุหรี่และในกลุ่มสูบบุหรี่แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นเพราะโดยธรรมชาติสำหรับคนไทย จำนวนเพศหญิงที่สูบบุหรี่มีน้อยกว่าเพศชาย รวมทั้งการศึกษานี้ไม่พบจีโนไทป์ชนิด homozygous ของ minor allele ของ *MT2A* -5A/G และพบความถี่ homozygous ของ minor allele ค่อนข้างต่ำใน *MT2A* +838C/G จึงอาจเป็นอุปสรรคต่ออำนาจการทดสอบทางสถิติ อาจมีผลทำให้ไม่แสดงผลกระทบร่วมของการสูบบุหรี่และโพลิมอร์ฟิซึมของ *MT2A* ต่อปัจจัยเสี่ยงของ CVD ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษารังต่อไปจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้นรวมทั้งมีการกระจายกลุ่มประชากรให้หลากหลายมากขึ้น เพื่อที่จะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมกับปัจจัยเสี่ยงต่อ CVD ได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการทุกท่าน ขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนครุภัณฑ์ อุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและกลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้วิจัยหลักได้รับทุนสนับสนุนจากทุนวิจัยสำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษาเพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญ ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva, Switzerland; 2011.
2. Hong Y. Burden of cardiovascular disease in Asia: big challenges and ample opportunities for action and making a difference. Clin Chem 2009; 55: 1450-2.
3. WHO. Health at a Glance: Asia/Pacific. Paris, France; 2012.
4. Daviglus ML, Talavera GA, Aviles-Santa ML, Allison M, Cai J, Criqui MH, et al. Prevalence of major cardiovascular risk factors and cardiovascular diseases among Hispanic/Latino individuals of diverse backgrounds in the United States. JAMA 2012; 308: 1775-84.
5. WHO. Mortality attributable to tobacco. WHO global report: Geneva, Switzerland; 2012.
6. Salahuddin S, Prabhakaran D, Roy A. Pathophysiological mechanisms of tobacco-related CVD. Global Heart 2012; 7: 113-20.
7. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: An update. J Am Coll Cardiol 2004; 43: 1731-7.
8. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. Atherosclerosis 2001; 158: 257-67.
9. Thielen A, Klus H, Müller L. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. Exp Toxicol Pathol 2008; 60: 141-56.
10. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. World J Surg Oncol 2011; 9: 1477-7819.
11. Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. Biochim Biophys Acta 2012; 1823: 1416-25.
12. Sabolic I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. Biometals 2010; 23: 897-926.
13. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. Mutat Res 2003; 533: 211-26.
14. Kita K, Miura N, Yoshida M, Yamazaki K, Ohkubo T, Imai Y, et al. Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A --> G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA. Hum Genet 2006; 120: 553-60.
15. Krześlak A, Forma E, Chwatko G, JÓźwiak P, Szymczyk A, Wilkosz J, et al. Effect of metallothionein 2A gene polymorphism on allele-specific gene expression and metal content in prostate cancer. Toxicol Appl Pharmacol 2013; 268: 278-85.
16. Kayaalti Z, Aliyev V, Soylemezoglu T. The potential effect of metallothionein 2A -5A/G single nucleotide polymorphism on blood cadmium, lead, zinc and copper levels. Toxicol Appl Pharmacol 2011; 256: 1-7.
17. Hesketh J. 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. Biochem Soc Trans 2004; 32: 990-3.
18. Krezel A, Maret W. Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. J Am Chem Soc 2007; 129: 10911-21.

19. Woods JS, Heyer NJ, Russo JE, Martin MD, Pillai PB, Farin FM. Modification of neurobehavioral effects of mercury by genetic polymorphisms of metallothionein in children. *Neurotoxicol Teratol* 2013; 39: 36-44.
20. Schoenborn CA, Adams PF, Peregoy Jabbar A. Health behaviors of adults: United states, 2008-2010. National Center For Health Statistics: Vital And Health Statistics: vital and health statistics, 2013.
21. Hammond D, Kin F, Prohm A, Kungskulniti N, Lian TY, Sharma SK, et al. Patterns of smoking among adolescents in Malaysia and Thailand: findings from the International Tobacco Control Southeast Asia survey. *Asia Pac J Public Health* 2008; 20: 193-203.
22. Wang H, Xue L, Yan R, Zhou Y, Wang MS, Cheng MJ, et al. Comparison of FIB-4 and APRI in Chinese HBV-infected patients with persistently normal ALT and mildly elevated ALT. *J Viral Hepat* 2013; 20: e3-e10.
23. O'Brien MM, Gonzales R, Shroyer AL, Grunwald GK, Daley J, Henderson WG, et al. Modest serum creatinine elevation affects adverse outcome after general surgery. *Kidney Int* 2002; 62: 585-92.
24. Prammasakun P. Hematologic disease diagnosis. *Blood*. Bangkok: Arunkanpim; 2011. p. 214.
25. Kayaalti Z, Soylemezoglu T. The polymorphism of core promoter region on metallothionein 2A-metal binding protein in Turkish population. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 185-90.
26. Tekin D, Kayaalti Z, Aliyev V, Soylemezoglu T. The effects of metallothionein 2A polymorphism on placental cadmium accumulation: Is metallothionein a modifying factor in transfer of micronutrients to the fetus? *J Appl Toxicol* 2012; 32: 270-5.
27. Giacconi R, Muti E, Malavolta M, Cipriano C, Costarelli L, Bernardini G, et al. The +838 C/G MT2A polymorphism, metals, and the inflammatory/immune response in carotid artery stenosis in elderly people. *Mol Med* 2007; 13: 388-95.
28. Program NCE. The third report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
29. Tonstad S, Cowan JL. C-reactive protein as a predictor of disease in smokers and former smokers: a review. *Int J Clin Pract* 2009; 63: 1634-41.
30. Asthana A, Johnson HM, Piper ME, Fiore MC, Baker TB, Stein JH. Effects of smoking intensity and cessation on inflammatory markers in a large cohort of active smokers. *Am Heart J* 2010; 160: 458-63.
31. Minami J, Ishimitsu T, Matsuoka H. Effects of smoking cessation on blood pressure and heart rate variability in habitual smokers. *Hypertension* 1999; 33: 586-90.
32. Asvold BO, Bjoro T, Nilsen TI, Vatten LJ. Tobacco smoking and thyroid function: a population-based study. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1428-32.
33. Mackay DF, Gray L, Pell JP. Impact of smoking and smoking cessation on overweight and obesity: Scotland-wide, cross-sectional study on 40,036 participants. *BMC Public Health* 2013; 13: 348.
34. Jang ES, Jeong SH, Hwang SH, Kim HY, Ahn SY, Lee J, et al. Effects of coffee, smoking, and alcohol on liver function tests: a comprehensive cross-sectional study. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 12-5.
35. Park EY, Lim MK, Oh JK, Cho H, Bae MJ, Yun EH, et al. Independent and supra-additive effects of alcohol consumption, cigarette smoking, and metabolic syndrome on the elevation of serum liver enzyme levels. *PLoS ONE* 2013; 8: e63439.
36. Wannamethee SG, Shaper AG. Cigarette smoking and serum liver enzymes: the role of alcohol

- and inflammation. *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 321-6.
37. Breitling LP, Raum E, Muller H, Rothenbacher D, Brenner H. Synergism between smoking and alcohol consumption with respect to serum gamma-glutamyltransferase. *Hepatology* 2009; 49: 802-8.
 38. Kayaalti Z, Mergen G, Soylemezoglu T. Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245: 252-5.
 39. Krzeslak A, Forma E, Jozwiak P, Szymczyk A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, et al. Metallothionein 2A genetic polymorphisms and risk of ductal breast cancer. *Clin Exp Med* 2012; 6: 6.
 40. rs28366003. [Online] NCBI. 2014; [cited 20 March 2014]: Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=28366003.
 41. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013; 1: 483-91.
 42. Chen H, Carlson EC, Pellet L, Moritz JT, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in pancreatic beta-cells reduces streptozotocin-induced DNA damage and diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 2040-6.
 43. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16: 1123-34.
 44. Kozarova R, Postadzhiyan A, Apostolova MD. Association of +1245 A/G MT1A and -209 A/G MT2A polymorphisms with coronary artery disease and diabetes mellitus in bulgarian cohort. *Med Biotechnol* 2011; 26: 100-6.
 45. Sato M, Yanagisawa H, Nojima Y, Tamura J, Wada O. Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase. *Clin Exp Hypertens* 2002; 24: 355-70.
 46. Tubek S. Role of zinc in regulation of arterial blood pressure and in the etiopathogenesis of arterial hypertension. *Biol Trace Elem Res* 2007; 117: 39-51.
 47. Yang L, Li H, Yu T, Zhao H, Cherian MG, Cai L, et al. Polymorphisms in metallothionein-1 and -2 genes associated with the risk of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: 18.