

ความสัมพันธ์ของ *ABCG5/G8* ยีนโพลีมอร์ฟิซึมกับระดับไขมันในเลือดในคนไทย

ศศิธร ไชยภูมิ^{1,2}, นงนุช เศรษฐเสถียร^{2,3}, ชนาตรี เศรษฐเสถียร^{2,4*}, รุจิรณ รัตบธรม^{2,5}, ปราภนา ยงสกุลชัย^{2,5},
อังกรัตน์ ศรุติไพบูลย์^{2,5}, นิสา เชาวราชกุล^{2,5}

Received: August 21, 2015

Revised & Accepted: October 14, 2015

บทคัดย่อ

โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตและเจ็บป่วยของคนทั่วโลก มีสาเหตุร่วมจากปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ATP-binding cassette (ABC) transporters G5 และ G8 (*ABCG5/G8*) เป็น membrane transporters ที่พบบนเซลล์บุผนังลำไส้เล็กและเซลล์ตับ มีบทบาทในการควบคุมภาวะสมดุลไขมันในร่างกาย มีหลายการศึกษาที่ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลีมอร์ฟิซึมของ *ABCG5/G8* และระดับไขมันในเลือด แต่ข้อมูลยังขัดแย้งกันและยังไม่เคยมีการศึกษาในคนไทย จึงได้ศึกษาผลของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG5/G8* กับระดับไขมันในเลือดและปัจจัยเสี่ยงอื่นของโรคหัวใจและหลอดเลือดในกลุ่มตัวอย่างคนไทย โดยศึกษายีนโพลีมอร์ฟิซึม 3 ชนิด ได้แก่ *ABCG5 Q604E C>G*, *ABCG8 5U145 A>C* และ *ABCG8 Y54C A>G* ด้วยเทคนิค allele-specific polymerase chain reaction พบความชุกของอัลลีล ดังนี้ *ABCG5 Q604E C>G* อัลลีล G ร้อยละ 81.3 และ C ร้อยละ 18.7 ส่วน *ABCG8 5U145 A>C* มีอัลลีล C ร้อยละ 84.9 และ A ร้อยละ 15.1 และ *ABCG8 Y54C A>G* มีอัลลีล G ร้อยละ 78.8 และ A ร้อยละ 21.2 การศึกษายีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG5/G8* กับระดับไขมันในเลือดและพารามิเตอร์ต่างๆ ในเบื้องต้นพบว่าผู้ที่มียีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG5 Q604E C>G* แบบ GG มีระดับ DBP และ TC สูงกว่า C carriers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน *ABCG8 5U145 A>C* พบว่าผู้ที่มียีนโพลีมอร์ฟิซึม CC มีระดับ TC, LDL-C และ LDL-C/HDL-C สูงกว่า A carriers รวมทั้งในเพศชายที่มีจีโนไทป์ CC พบว่ามีค่า SBP และ DBP สูงกว่า A carriers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน ส่วน *ABCG8 Y54C A>G* ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของพารามิเตอร์ใดๆ ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์แยกตามเพศพบว่าโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG8 5U145 A>C* ในเพศชายที่มีจีโนไทป์ CC มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง 4.81 เท่า (OR 4.81, 95%CI: 1.45-16.02) เมื่อเทียบกับ AC และ AA เมื่อวิเคราะห์ผลกระทบรวม พบว่าในเพศหญิงที่มีจีโนไทป์ร่วมระหว่าง *ABCG5 Q604 C>G* กับ *ABCG8 5U145 A>C*, แบบ GG/CC มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติมากกว่า GC/AC, GC/AA, CC/CC, CC/AC, และ CC/AA 2.48 เท่า (OR 2.48, 95%CI: 1.02-6.03) การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่เกี่ยวกับโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *ABCG5/G8* ในกลุ่มตัวอย่างคนไทย และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *ABCG5/G8* กับความผิดปกติของไขมันและภาวะความดันโลหิตสูง อีกทั้งยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้เป็นแนวทางในการแนะนำและการป้องกันความเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

คำสำคัญ: โรคหัวใจและหลอดเลือด, โปรตีนขนส่งไขมัน ATP-binding cassette G5 และ G8 (*ABCG5/G8*), ยีนโพลีมอร์ฟิซึม

¹นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²กลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาสาขาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

The association of *ABCG5/G8* gene polymorphisms with blood lipid profile in Thais

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

Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are the chronic diseases and the leading cause of global death and disability. Risk factors for CVD are encompassing both genetics and environmental background. ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (*ABCG5/G8*) are membrane transporters that express on enterocytes and hepatocytes; they play roles in the regulation of body lipid homeostasis. Several studies have investigated the association of *ABCG5/G8* gene polymorphisms on blood lipids, however, with controversial results. In addition, there are no reports regarding *ABCG5/G8* gene polymorphisms in Thai population. The objective of present study was to determine the association of *ABCG5/G8* gene polymorphisms and lipid profile as well as other CVD risk factors in Thais. The *ABCG5* Q604E C>G, *ABCG8* 5U145 A>C, and *ABCG8* Y54C A>G gene polymorphisms were determined using allele-specific polymerase chain reaction (ASPCR) technique. The respective major and minor alleles were: G (81.3%) and C (18.7%) for *ABCG5* Q604E C>G; C (84.9%) and A (15.1%) for *ABCG8* 5U145 A>C; and G (78.8%) and A (21.2%) for *ABCG8* Y54C A>G. The individuals with GG genotype of *ABCG5* Q604E C>G showed significantly higher level of DBP and TC than C carriers. For *ABCG8* 5U145 A>C, subjects with CC genotype demonstrated significantly higher level of TC, LDL-C, and LDL-C/HDL-C than those with A allele. There were no statistically significant differences of either lipid levels or other CVD risk factors among genotypes of *ABCG8* Y54C A>G. Association study initially demonstrated, only in male subjects, that CC genotype of *ABCG8* 5U145 A>C significantly increased the risk of hypertension (OR 4.81, 95%CI: 1.45-16.02) as compared with A allele carriers (AC+AA). Further investigation for the combined effect revealed significant association of combined GG/CC genotypes of *ABCG5* Q604E C>G and *ABCG8* 5U145 A>C with increase risk of dyslipidemia (OR 2.48, 95%CI: 1.02-6.03) compared to CG/AC, CG/AA, CC/CC, CC/AC, and CC/AA genotypes, however only in female subjects. This is the first report regarding the study of *ABCG5/G8* gene polymorphisms in Thais. The present results demonstrate the associations of *ABCG5/G8* gene polymorphisms with abnormal lipid profile and hypertension, and provide as preliminary information for more comprehensive study with the ultimate aim for CVD prevention campaign.

Keywords: Cardiovascular disease (CVD), ATP-binding cassette transporter G5/G8 (*ABCG5/G8*), Gene polymorphisms

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 disease, CVD) เป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือด ที่สำคัญได้แก่โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease, CAD) และโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) โดยส่วนใหญ่มีสาเหตุจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ⁽¹⁾

โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและเจ็บป่วยของคนทั่วโลก จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ในปี ค.ศ. 2008 มีจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือดประมาณ 17 ล้านคน และคาดว่าในปี ค.ศ. 2030 จะมีผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นเป็น 23.6 ล้านคน⁽¹⁾ ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุขของไทย รายงานว่าในปี ค.ศ. 2009 โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของคนไทย เป็นอันดับ 3 รองจากอุบัติเหตุและโรคมะเร็ง โดยมีอัตราการเสียชีวิต 4 คน/1 ชั่วโมง และคาดว่าจะเพิ่มขึ้น 3 เท่าในอีก 10 ปีข้างหน้า^(2,3)

ในกรณีของโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีสาเหตุจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง จะพบ atherosclerotic plaque ที่ผนังหลอดเลือด เกิดการตีบแคบของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ และหากเกิด plaque rupture จะนำไปสู่การเกิด thrombosis และหลอดเลือดอุดตันในที่สุด⁽⁴⁾ ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด (myocardial infarction) ปัจจัยเสี่ยงที่ส่งเสริมการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง ได้แก่ การสูบบุหรี่ ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน การขาดการออกกำลังกาย การมีน้ำหนักตัวเกิน โรคอ้วน การดื่มแอลกอฮอล์ในปริมาณมาก และการมีความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด เป็นต้น⁽¹⁾ ซึ่งหากควบคุมปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้ จะสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลกระทบต่อความเสี่ยงของการเกิดโรคและเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตามในผู้ที่มีพันธุกรรมที่เป็นปัจจัยเสี่ยง การเพิ่มความระวังในการดำเนินชีวิตประจำวันให้มีคุณภาพ จะช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคดังกล่าว

Membrane transporters ชนิด ATP-binding cassette G5 และ G8 (ABCG5/G8) เป็น co-transporters ที่ทำงานร่วมกันในลักษณะ heterodimer อยู่บนเยื่อเมมเบรนของเซลล์บุผนังลำไส้เล็ก (enterocytes) และ เซลล์ตับ (hepatocytes)⁽⁶⁻⁸⁾ ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับของ cholesterol

และ sterols จากพืช (phytosterols) ที่ได้รับจากอาหาร โดยการขนย้าย (efflux) สารดังกล่าวออกจาก enterocytes กลับไปยังทางเดินลำไส้ และจาก hepatocyte เข้าสู่ทางเดินน้ำดี (bile canaliculi) จึงมีส่วนช่วยควบคุมระดับไขมันทั้ง 2 ชนิดในเลือดได้⁽⁹⁾ ABCG5 และ ABCG8 ถูกสร้างจากยีน ABCG5 และ ABCG8 มีรายงานการศึกษาพบว่ายีนโพลีมอร์ฟิซึม (gene polymorphisms) หลายตำแหน่งบน ABCG5 และ ABCG8 มีผลต่อระดับ cholesterol และ phytosterols ชนิดต่างๆในเลือด โดยมีผลลดประสิทธิภาพในการขนส่ง cholesterol ผ่านกระบวนการ reverse cholesterol transport กลับไปที่ตับรวมทั้งการขนส่ง phytosterols เพื่อขับออกสู่ทางเดินน้ำดี จนอาจเกิดการสะสมตามเนื้อเยื่อต่างๆ^(7,10,11) และนำไปสู่การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ในที่สุด⁽¹²⁾

การศึกษาที่ผ่านมา ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลีมอร์ฟิซึมของ ABCG5/G8 และระดับไขมันในเลือด แต่ข้อมูลยังมีความแตกต่างกัน อีกทั้งข้อมูลบางส่วนยังขัดแย้งกันในแต่ละเชื้อชาติ⁽¹³⁻¹⁷⁾ จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในคนไทย ดังนั้นจึงนำมาสู่หัวข้อการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนยิ่งขึ้นและเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการรณรงค์ทางสุขภาพในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งและโรคหัวใจและหลอดเลือดในกลุ่มประชากรไทย

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว กลุ่มตัวอย่างมีจำนวน 440 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 128 ราย และเพศหญิง 312 ราย ทุกคนได้รับการชี้แจงรายละเอียดโครงการ ลงนามในใบยินยอมและตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับประวัติสุขภาพทั่วไป กลุ่มตัวอย่างต้องไม่เป็นโรคที่มีผลกระทบต่อระดับไขมันในเลือด ได้แก่ โรคตับ โรคไต โรคมะเร็งหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ ซึ่งดูได้จากผลการซักประวัติและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยระดับสารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต้องอยู่ในช่วงค่าอ้างอิง คือ blood urea nitrogen (BUN) < 19.1 mg/dL, creatinine < 1.5 mg/dL, uric acid < 8.5 mg/dL, alanine aminotransferase (ALT) < 50 U/L, aspar-

tate aminotransferase (AST) ≤ 52 U/L และ alkaline phosphatase (ALP) ≤ 147 U/L ซึ่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง เพื่อคำนวณค่าดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) วัดความดันโลหิต รอบเอว (waist circumference, W) และรอบสะโพก (hip circumference, H)

2. การเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของกลุ่มตัวอย่างทั้งดอาหารและเครื่องดื่มมาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง แบ่งเลือดออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกไม่มีสารกันเลือดแข็งเพื่อเตรียมซีรัม ใช้ตรวจระดับไขมันในเลือด (lipid profile ได้แก่ total cholesterol (TC), triglycerides (TG) และ high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ส่วน low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) คำนวณจากสูตร Friedewald equation⁽¹⁸⁾ ตรวจการทำงานของไต (BUN, creatinine และ uric acid) และตรวจเอนไซม์จากตับ (ALT, AST และ ALP) ส่วนที่สองเตรียมเป็นพลาสมา มีโซเดียมฟลูออไรด์ เป็นสารกันเลือดแข็ง ใช้ตรวจระดับกลูโคส (fasting blood glucose, FBG) ส่วนสุดท้ายเป็นเลือดรวมมี ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็ง ใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจยีนโพลีมอร์ฟิซึม

3. การตรวจ *ABCG5/G8* ยีนโพลีมอร์ฟิซึม

3.1 ตรวจยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG5* Q604E C>G (rs6720173) ด้วยเทคนิค allele specific polymerase chain reaction restriction (ASPCR) ใช้ primers 2 ชุดที่ออกแบบสำหรับการศึกษาครั้งนี้ และทำการสังเคราะห์ โดย Integrated DNA Technology (Integrated DNA Technologies Inc, Singapore) ได้แก่ inner (allele specific) forward และ reverse primers และ outer forward และ reverse primers ส่วนผสมต่างๆในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 μ L ประกอบด้วย primer แต่ละชนิดความเข้มข้น 1 pmol, dNTPs (Promega) (Promega Corporation, Madison, WI) 0.2 mM, PCR buffer 1X (Invitrogen) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), $MgCl_2$ 1.5 mM (Invitrogen), *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) และ DNA ของกลุ่มตัวอย่าง 100 ng ทำ PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler G-strom (Gene Technologies Ltd, Essex, UK) โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย PCR cycle ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 55 °C เป็น

เวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และสำหรับ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที แยก amplified products ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ที่มีส่วนผสมของสีย้อม ethidium bromide จีโนไทป์ (genotype) แบบ CC ให้ผล DNA ขนาด 118 และ 277 bp จีโนไทป์ CG ให้ผล DNA ขนาด 118, 208 และ 277 bp ส่วนจีโนไทป์ GG จะให้ผลผลิต DNA ขนาด 208 และ 277 bp

3.2 ตรวจยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG8* 5U145 A>C (rs3806471) ด้วยเทคนิค ASPCR ใช้ primers 2 ชุดเช่นกัน ส่วนผสมต่างๆในปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยมีขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย PCR cycle ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที, 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และสำหรับ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที แยก amplified products ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ที่มีส่วนผสมของสีย้อม ethidium bromide จีโนไทป์แบบ AA จะให้ผลผลิต DNA ขนาด 239 และ 323 bp จีโนไทป์ AC ให้ผล DNA ขนาด 127, 239 และ 323 bp ส่วนจีโนไทป์แบบ CC ให้ผล DNA ขนาด 127 และ 323 bp

3.3 ตรวจยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG8* Y54C A>G (rs4148211) ด้วยเทคนิค ASPCR โดยใช้ primers 2 ชุดเช่นกัน ส่วนผสมต่างๆในปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่ใช้ $MgCl_2$ 2.0 mM ทำ PCR ตามขั้นตอนเดียวกับข้อ 3.2 จีโนไทป์แบบ AA จะให้ผลผลิต DNA ขนาด 225 และ 330 bp จีโนไทป์ AG ให้ผล DNA ขนาด 148, 225 และ 330 bp ส่วนจีโนไทป์แบบ GG ให้ผล DNA ขนาด 148 และ 330 bp

การตรวจยีนโพลีมอร์ฟิซึมทั้ง 3 ชนิดได้ยืนยันผลการตรวจด้วยการทำ DNA sequencing โดยการสุ่มอย่างน้อยร้อยละ 10 จากตัวอย่างทั้งหมด

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลใช้ Kolmogorov-Smirnov test ถ้าข้อมูลมีการกระจายแบบ non-normal distribution จะถูกแปลงเป็นค่า log 10 ก่อนนำมาวิเคราะห์ โดยข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบ normal distribution จะแสดงเป็น mean $\pm$ SD ส่วนข้อมูลที่มีการกระจาย

ตัวแบบ non-normal distribution แสดงค่าเป็น geometric means (minimum, maximum) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้ Chi-square test วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่เป็นค่าต่อเนื่องระหว่างสองกลุ่มใช้ independent-sample *t*-test ส่วนการหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG5/G8* กับภาวะความผิดปกติต่างๆ ใช้ Logistic regression analysis แสดงค่าเป็น Odds ratio (OR) โดยค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

ระดับสารชีวเคมีในเลือดรวมทั้งตัวแปรต่างๆทางคลินิกมีความแตกต่างกันระหว่างเพศชายและหญิง โดยพบว่าเพศชายมีอายุเฉลี่ย, systolic blood pressure (SBP),

ระดับ TG, TG/HDL-C, BUN, creatinine, uric acid, ALT และ AST สูงกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่เพศหญิงมีค่า BMI, รอบเอว, TC, HDL-C, LDL-C, LDL-C/HDL-C, ALP และภาวะอ้วน สูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ไม่ได้แสดงผลการศึกษา)

การกระจายความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของ *ABCG5/G8* โพลีมอร์ฟิซึมทั้ง 3 ชนิดในประชากรที่ศึกษา เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg equilibrium โดยยีนโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG5 Q604E C>G* พบว่าอัลลีล *G* มีความถี่ร้อยละ 81.3 มากกว่าอัลลีล *C* (ร้อยละ 18.7) ส่วน *ABCG8 5U145 A>C* พบอัลลีล *C* มีความถี่ร้อยละ 84.9 มากกว่าอัลลีล *A* (ร้อยละ 15.1) สำหรับ *ABCG8 Y54C A>G* พบอัลลีล *G* ร้อยละ 78.8 มากกว่าอัลลีล *C* (ร้อยละ 21.2) ดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของยีน *ABCG5 Q604E C>G*, *ABCG8 5U145 A>C* และ *ABCG8 Y54C A>G* ในกลุ่มตัวอย่าง

ยีนโพลีมอร์ฟิซึม	ความถี่จีโนไทป์	ความถี่อัลลีล
<i>ABCG5 Q604E C>G</i>	<i>GG</i> , % (n) = 66.0 (284) <i>CG</i> , % (n) = 30.5 (131) <i>CC</i> , % (n) = 3.5 (15)	<i>G</i> , % (n) = 81.3 (699) <i>C</i> , % (n) = 18.7 (161)
<i>ABCG8 5U145 A>C</i>	<i>CC</i> , % (n) = 71.6 (308) <i>AC</i> , % (n) = 26.5 (114) <i>AA</i> , % (n) = 1.9 (8)	<i>C</i> , % (n) = 84.9 (730) <i>A</i> , % (n) = 15.1 (130)
<i>ABCG8 Y54C A>G</i>	<i>GG</i> , % (n) = 62.6 (269) <i>AG</i> , % (n) = 32.6 (140) <i>AA</i> , % (n) = 4.9 (21)	<i>G</i> , % (n) = 78.8 (678) <i>A</i> , % (n) = 21.2 (182)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *ABCG5/G8* โพลีมอร์ฟิซึม กับข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด พบว่าโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG5 Q604E C>G* กลุ่มจีโนไทป์ *GG* มีระดับ DBP และ TC สูงกว่า กลุ่ม *C* carriers (*CC+CG*) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อวิเคราะห์แยกตามเพศพบว่าความแตกต่างดังกล่าวพบเฉพาะในเพศหญิง โดยระดับ TC และ LDL-C ในกลุ่ม *GG* มีค่าสูงกว่าในกลุ่ม *C* carriers ($P = 0.018$ และ 0.026 ตามลำดับ) ส่วนโพลีมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG8 5U145 A>C* พบว่าผู้ที่มียีนจีโนไทป์ *CC* มีระดับ TC, LDL-C และ LDL-C/HDL-C สูงกว่ากลุ่ม

A carriers (*AA+AC*) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อวิเคราะห์แยกตามเพศพบว่าในเพศชายที่มีจีโนไทป์ *CC* มีระดับของทั้ง SBP และ DBP สูงกว่ากลุ่มที่เป็น *A* carriers ($P = 0.020$ และ 0.018) สำหรับ *ABCG8 Y54C A>G* ไม่พบความแตกต่างของพารามิเตอร์ใดๆ ระหว่างจีโนไทป์ (ไม่ได้แสดงผลการศึกษา)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลีมอร์ฟิซึมของ *ABCG5/G8* ทั้งสามชนิดกับภาวะความผิดปกติต่างๆ ได้แก่ ภาวะความดันโลหิตสูง (hypertension; HT) เบาหวาน (diabetes mellitus; DM) ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ

(dyslipidemia) ภาวะอ้วน และ เมแทบอลิกซินโดรม (metabolic syndrome, MS) นั้น ไม่พบความสัมพันธ์แต่อย่างใด (ไม่ได้แสดงผลการศึกษา)

เมื่อวิเคราะห์แยกตามเพศ พบว่าโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG8 5U145 A>C* จีโนไทป์แบบ *CC* มีความเสี่ยงต่อ

การเกิดภาวะความดันโลหิตสูง 4.81 เท่าเมื่อเทียบกับ *AC+AA* (adjusted OR = 4.81, 95%CI: 1.45-16.02, *P* = 0.010) โดยพบความสัมพันธ์เฉพาะในเพศชาย ดัง ตารางที่ 2 แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าวในเพศหญิง

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ABCG8 5U145 A>C* กับภาวะความดันโลหิตสูงในกลุ่มตัวอย่างเพศชาย

Blood pressure	<i>ABCG8 5U145</i> , % (n)		<i>P</i> - value
	<i>CC</i> (n = 85)	<i>AC+AA</i> (n = 43)	
Normotension	69.4 (59)	90.7 (39)	0.008
Hypertension	30.6 (26)	9.3 (4)	
OR (95% CI)	4.81 (1.45-16.02)	1.00 (reference)	0.010

Normotension: SBP < 140 mmHg และ diastolic blood pressure (DBP) < 90 mmHg, Hypertension: SBP ≥ 140 mmHg หรือ DBP ≥ 90 mmHg [แนวทางการรักษาภาวะความดันโลหิตสูงในเวชปฏิบัติทั่วไป (Guidelines in the treatment of hypertension) สมาคมความดันโลหิตสูงแห่งประเทศไทย] ค่า Odds ratio ได้ปรับอายุ และภาวะไขมันในเลือดผิดปกติแล้ว

เนื่องจาก *ABCG5* และ *ABCG8* ทำงานร่วมกันเป็นลักษณะ hetero-dimers หรือ half-transporter (*ABCG5/8*) ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลกระทบร่วม (combined effect) ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม ระหว่าง *ABCG5* และ *ABCG8* ได้แก่ *ABCG5 Q604E C>G* กับ *ABCG8 5U145 A>C* และ *ABCG5 Q604E C>G* กับ *ABCG8 Y54C A>G* ต่อความเสี่ยงการเกิดภาวะความผิดปกติต่างๆ

ผลการศึกษาพบว่าเพศหญิงที่มีโพลีมอร์ฟิซึมร่วมระหว่าง *ABCG5 Q604E C>G* และ *ABCG8 5U145 A>C* ที่มีจีโนไทป์ร่วมแบบ *GG/CC* มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ 2.66 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ร่วมแบบ *CG/AC*, *CG/AA*, *CC/CC*, *CC/AC*, และ *CC/AA* (OR = 2.66, 95% CI: 1.09-6.50) ดัง ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลกระทบร่วม (combined effect) ของยีน *ABCG5 Q604E C>G* และ *ABCG8 5U145 A>C* ต่อความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติในเพศหญิง

<i>ABCG 5Q604E C>G</i> + <i>ABCG8 5U145 A>C</i>	Normolipidemia n (%)	Dyslipidemia n (%)	Odds ratio	95% CI
<i>GG/CC</i>	19 (38.0)	139 (54.3)	2.48	1.02-6.03
<i>GG/AC</i> + <i>GG/AA</i> + <i>CG/CC</i>	21 (42.0)	88 (34.4)	1.50	0.63-3.61
<i>CG/AC</i> + <i>CG/AA</i> + <i>CC/CC</i> + <i>CC/AC</i> + <i>CCAA</i>	10 (20.0)	29 (11.3)	1	-

ภาวะ dyslipidemia จะต้องมีความผิดปกติของ parameter อย่างน้อย 1 ข้อดังนี้, TC ≥ 200 mg/dL, TG ≥ 150 mg/dL, LDL-C > 100 mg/dL หรือ HDL-C < 40 mg/dL (ในเพศชาย) หรือ HDL-C < 50 mg/dL (ในเพศหญิง) ค่า Odds ratio ได้ปรับอายุ โรคเบาหวาน และภาวะอ้วน (BMI ≥ 25 kg/m²) แล้ว

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิดรวมทั้งโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดบุคคลที่มีพันธุกรรมที่เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคดังกล่าวการเพิ่มความระวังในการดำเนินชีวิตประจำวันก็สามารถลดโอกาสในการเกิดโรคได้ ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมพบได้ในประชากรทั่วไปในลักษณะของความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือยีนโพลิมอร์ฟิซึม ซึ่งมีความแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติ การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของยีนโพลิมอร์ฟิซึม *ABCG5/G8* ทั้ง 3 ชนิดครั้งนี้ พบว่ายีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG5 Q604E C>G* จีโนไทป์ *GG* มีความถี่มากที่สุด (ร้อยละ 67.8) รองลงมาคือ *CG* (ร้อยละ 30.0) และ *CC* มีความถี่ต่ำสุด (ร้อยละ 2.2) ซึ่งการกระจายความถี่จีโนไทป์นี้คล้ายคลึงกับชาวเอเชีย (จีนและญี่ปุ่น)^(12, 19) และแอฟริกัน⁽¹⁹⁾ แต่แตกต่างจากชาวสเปน⁽²⁰⁾ และอเมริกัน⁽²¹⁾ ส่วนยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG8 5U145 A>C* จีโนไทป์ *CC* มีความถี่มากที่สุด (ร้อยละ 71.5) รองลงมาคือ *AC* (ร้อยละ 26.4) และ *AA* มีความถี่ต่ำสุด (ร้อยละ 2.1) การกระจายของความถี่จีโนไทป์นี้คล้ายคลึงกับชาวเอเชีย (จีนและญี่ปุ่น)⁽¹²⁾ เช่นกัน แต่จะแตกต่างจากชาวยุโรป⁽²²⁾ และยีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG8 Y54C A>G* จีโนไทป์ *GG* มีความถี่มากที่สุด (ร้อยละ 60.1) รองลงมาคือ *AG* (ร้อยละ 34.4) และ *AA* มีความถี่ต่ำสุด (ร้อยละ 5.5) ซึ่งคล้ายคลึงกับชาวเอเชีย (จีนและญี่ปุ่น)⁽¹²⁾ แต่แตกต่างจากชาวยุโรปและแอฟริกัน⁽²³⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษายีนโพลิมอร์ฟิซึม *ABCG5/G8* ทั้ง 3 ชนิดนี้ ยังไม่เคยมีรายงานในคนไทยมาก่อน

ผลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าโพลิมอร์ฟิซึมของ *ABCG5/G8* ทั้ง 3 ชนิด ถึงแม้จะไม่ได้ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดโดยตรง แต่อาจเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคได้เนื่องจากกระบวนการเกิดโรคดังกล่าวเกิดจากปัจจัยเสี่ยงหลายอย่างร่วมกัน⁽⁵⁾ โดยพบความสัมพันธ์ของโพลิมอร์ฟิซึมกับการมีระดับไขมันในเลือดที่ผิดปกติในกลุ่มประชากรที่ศึกษา ซึ่งการมีระดับไขมันในเลือดที่ผิดปกติ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยอาจจะส่งผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และ endothelial dysfunction นำไปสู่การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง อันเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้⁽²⁵⁾

เมื่อมีการวิเคราะห์ข้อมูลแยกเพศ พบว่ายีนโพลิมอร์ฟิซึมชนิด *ABCG8 5U145; A>C* จีโนไทป์แบบ *CC*

มีค่าความเสี่ยงต่อการเกิดความดันโลหิตสูง 4.81 เท่าเมื่อเทียบกับ *AC+AA* เฉพาะในเพศชาย ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่าในเพศชายที่มีจีโนไทป์ *CC* มีระดับของทั้ง *SBP* และ *DBP* สูงกว่ากลุ่มที่เป็น *A carriers* อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันผลในจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นและมีสัดส่วนของกลุ่มที่มีภาวะความดันโลหิตสูงเพิ่มขึ้นต่อไป

จากผลการศึกษาผลกระทบร่วมระหว่างยีนโพลิมอร์ฟิซึมของ *ABCG5* และ *ABCG8* โดยพบว่าในเพศหญิงที่มี *ABCG5 Q604E C>G* และ *ABCG8 5U145 A>C* จีโนไทป์ร่วมแบบ *GG/CC* มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติมากกว่า *CG/AC, CG/AA, CC/CC, CC/AC*, และ *CC/AA* มีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์เบื้องต้นที่แสดงว่าผู้ที่มียีน *ABCG5 Q604E C>G* จีโนไทป์ *GG* มีระดับของ *TC* สูงกว่า *C carriers (CC+CG)* และผู้ที่มียีน *ABCG8 5U145 A>C* จีโนไทป์ *CC* มีระดับของทั้ง *TC* และ *LDL-C* สูงกว่า *A carriers (AA+AC)* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทำหน้าที่ร่วมกัน ของ *ABCG5* และ *ABCG8* ในลักษณะ hetero-dimer ในการลดการดูดซึม cholesterol และ phytosterol ที่ผนังลำไส้ รวมทั้งการขับ cholesterol และ phytosterol จากเซลล์ตับออกสู่ทางเดินน้ำดี⁽⁹⁾ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เบสและมีผลทำให้มีการสร้างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปเช่นในกรณีของ *ABCG5 Q604E C>G* มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนอาจจะส่งผลทำให้โปรตีนทำหน้าที่ได้ลดลง⁽²⁴⁾ หรือการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เบสที่ตำแหน่งที่อาจมีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนเช่นในกรณีของ *ABCG8 5U145 A>C* ซึ่งเป็นตำแหน่งบน 5'untranslated region ของ *ABCG8* ดังนั้นผลกระทบร่วมของทั้ง *ABCG5 Q604E C>G* และ *ABCG8 5U145 A>C* จึงเพิ่มโอกาสการเกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติได้มากกว่า⁽²⁴⁾

โดยสรุปการศึกษานี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนโพลิมอร์ฟิซึมของ *ABCG5/G8* ทั้ง 3 ชนิดและระดับไขมันในเลือดที่ทำการศึกษครั้งแรกในคนไทย ซึ่งในเบื้องต้นพบว่ายีนโพลิมอร์ฟิซึม *ABCG5 Q604E C>G* และ *ABCG8 5U145 A>C* มีความเกี่ยวข้องกับภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ แต่ไม่พบความเกี่ยวข้องดังกล่าวใน *ABCG8 Y54C A>G* เมื่อวิเคราะห์ผลกระทบร่วมของ *ABCG5 Q604E C>G* และ *ABCG8 5U145 A>C* พบว่ายีนโพลี

ร่วม *GG/CC* เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติได้มากกว่าจีโนไทป์ร่วม *CG/AC*, *CG/AA*, *CC/CC*, *CC/AC*, และ *CC/AA* อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้อาจมีผลกระทบจากตัวแปรอื่นร่วมด้วย เช่นอาหาร การออกกำลังกาย การดื่มสุรา การสูบบุหรี่ และประวัติครอบครัว เป็นต้น ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นแนวทางในการแนะนำและการป้องกันความเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการทุกท่าน ขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ และกลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนครุภัณฑ์ อุปกรณ์ และสถานที่ การดำเนินการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- World Health Organization. Global atlas on cardiovascular diseases prevention and control. [online] 2011 [cited 2014 July 23]; Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf.
- Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases in Thailand. Thailand: Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control Ministry of Public Health, 2010.
- Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases in Thailand. Thailand: Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control Ministry of Public Health, 2011.
- Sdringola S, Loghin C, Boccalandro F, Gould KL. Mechanisms of progression and regression of coronary artery disease by PET related to treatment intensity and clinical events at long-term follow-up. *J Nucl Med* 2006; 47: 59-67.
- Kathiresan S, Srivastava D. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell* 2012; 148: 1242-57.
- Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, et al. Identification of a gene, *ABCG5*, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001; 27: 79-83.
- Voloshyna I, Reiss AB. The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 213-24.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000; 290: 1771-5.
- Sabeva NS, Liu J, Graf GA. The *ABCG5* *ABCG8* sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16: 172-7.
- Salen G, Patel S, Batta AK. Sitosterolemia. *Cardiovasc Drug Rev* 2002; 20: 255-70.
- Miettinen TA. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* 1980; 10: 27-35.
- Li Q, Yin RX, Wei XL, Yan TT, Aung LH, Wu DF, et al. ATP-binding cassette transporter *G5* and *G8* polymorphisms and several environmental factors with serum lipid levels. *PLoS One* 2012; 7: 24.
- Hubacek JA, Berge KE, Stefkova J, Pitha J, Skodova Z, Lanska V, et al. Polymorphisms in *ABCG5* and *ABCG8* transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res* 2004; 53: 395-401.
- Plat J, Bragt MC, Mensink RP. Common sequence variations in *ABCG8* are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res* 2005; 46: 68-75.
- Miwa K, Inazu A, Kobayashi J, Higashikata T, Nohara A, Kawashiri M, et al. ATP-binding cas-

- sette transporter G8 M429V polymorphism as a novel genetic marker of higher cholesterol absorption in hypercholesterolaemic Japanese subjects. *Clin Sci* 2005; 109: 183-8.
16. Acalovschi M, Ciocan A, Mostean O, Tirziu S, Chiorean E, Keppeler H, et al. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones. *Eur J Intern Med* 2006; 17: 490-4.
 17. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, et al. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004; 45: 1660-5.
 18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 1972; 18: 499-502.
 19. NCBI. Database SNPs: Population Diversity (rs6720173) 2015 [2015 June 9]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6720173.
 20. Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Fuentes F, Mata P, Lopez-Miranda J, Alonso R, et al. Genetic variations at ABCG5/G8 genes modulate plasma lipids concentrations in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2010; 210: 486-92.
 21. Kajinami K, Brousseau ME, Nartsupha C, Ordoñas JM, Schaefer EJ. ATP binding cassette transporter G5 and G8 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin. *J Lipid Res* 2004; 45: 653-6.
 22. NCBI. Database SNPs: Population Diversity (rs3806471) 2015 [2015 June 9]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3806471.
 23. NCBI. Database SNPs: Population Diversity (rs4148211) 2015; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4148211.
 24. Jakulj L, Vissers MN, Tanck MW, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJ, et al. ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. *J Lipid Res* 2010; 51: 3016-23.
 25. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; 115: 1285-95.