

Relationship of platelet glycoprotein Ia C807T/G873A gene polymorphisms to severity of coronary artery stenosis in Thai patients with coronary artery disease

Songpol Howhan^{1,2} Nantarat Komansin^{2,3*} Nongnuch Settasatian^{2,4} Chatri Settasatian^{2,5}
Upa Kukongwiryapan^{2,6} Pongsak Intharapetch^{2,7} Kasem Tantipanichteerakul^{2,7} Vichai Senthong^{2,7}
Paisal Mongkolwongroj^{2,3}

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

²Cardiovascular Research Group

³Department of Clinical Microscopy

⁴Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

⁵Department of Pathology

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

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

*Corresponding author: (Email: nankom@kku.ac.th)

Abstract

Individuals who have more numbers of healed plaque rupture and hypercoagulable state such as high platelet activity may have an impact on a rapid progression of vascular stenosis. The C807T/G873A polymorphisms in the glycoprotein (GP) Ia gene are associated with a variable expression of the receptor on platelet membrane which involved in platelet adhesion to the injured vessel. This study therefore aimed to determine the relationship between platelet GPIa C807T/G873A gene polymorphisms and the severity of vascular stenosis in Thai patients. A total of 212 subjects who clinically suspected for coronary artery disease (CAD) underwent coronary angiography at the Cardiac Catheterization Unit, Queen Sirikit Heart Center of the Northeast Hospital, Khon Kaen University were recruited in the study. The polymorphisms were determined by multiplex allele specific polymerase chain reaction whilst the severity of CAD was evaluated by Gensini scoring system and the number of major coronary artery with stenosis greater than 50%. The results showed that genotype frequencies of CC/GG, CT/GA and TT/AA were 56.6, 37.3 and 6.1%, respectively. In addition, association of the polymorphisms with the severity of CAD evaluated by using either Gensini score or the number of vascular stenosis was not demonstrated. In conclusion, the results of this study suggest that determination of GPIa C807T/G873A polymorphisms may not be enough for prediction of the severity of vascular stenosis in Thai patients with CAD. ***Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2013; 46(3): 273-284***

Keywords: Coronary artery disease, polymorphism, glycoprotein Ia

ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีนไทโคโปรตีน Ia ของเกล็ดเลือดกับการตีบของหลอดเลือดหัวใจในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารีชาวไทย

ทรงพล ห้าวหาญ^{1,2} นันทรัตน์ ไข่มานะสิน^{2,3*} นงนุช เศรษฐเสถียร^{2,4} ชาดรี เศรษฐเสถียร^{2,5}
 ยุพา คู่คงวิชัยพันธุ์^{2,6} พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร^{2,7} เกษม ต้นตพานิชธีระกุล^{2,7} วิชัย เส้นทอง^{2,7}
 ไพศาล มงคลวงศ์โรจน์^{2,3}

¹นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

²กลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด

³กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก

⁴กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵ภาควิชาพยาธิวิทยา

⁶ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁷ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาควิชาวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: nankom@kku.ac.th)

บทคัดย่อ

ผู้ที่มีการแตกของ atherosclerotic plaque เกิดขึ้นบ่อยครั้งร่วมกับการมีภาวะเลือดมีการแข็งตัวง่ายกว่าปกติ เช่น เกล็ดเลือดทำหน้าที่มากกว่าปกติ อาจมีผลทำให้หลอดเลือดหัวใจตีบแคบได้เร็วขึ้น ซึ่งโพลีมอร์ฟิซึมชนิด C807T/G873A ของจีนไทโคโปรตีน Ia ของเกล็ดเลือดมีผลต่อการแสดงออกของไกลโคโปรตีน Ia/IIa ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับหลอดเลือดที่มีการฉีกขาด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีนไทโคโปรตีน Ia ของเกล็ดเลือดกับการตีบแคบของหลอดเลือดหัวใจ ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารีชาวไทย โดยทำการศึกษาในอาสาสมัคร 212 ราย ที่มีอาการเข้าข่ายโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารีและได้รับการบันทึกภาพหลอดเลือดหัวใจด้วยรังสี (coronary angiography) ที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาควิชาวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมด้วยวิธี multiplex allele specific polymerase chain reaction ประเมินความรุนแรงการตีบของหลอดเลือดโดยใช้ค่า Gensini score และจำนวนของหลอดเลือดหัวใจหลักที่มีการตีบมากกว่าร้อยละ 50 สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ได้จากแบบสอบถาม ผลการตรวจร่างกาย และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่าความถี่ของจีโนไทป์ CC/GG, CT/GA และ TT/AA เท่ากับร้อยละ 56.6, 37.3 และ 6.1 ตามลำดับ โดยความถี่ของจีโนไทป์ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ที่มีความรุนแรงการตีบของหลอดเลือดแตกต่างกันทั้งจากการประเมินด้วย Gensini score และจำนวนหลอดเลือดหัวใจที่ตีบ จากผลการศึกษานี้อาจแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีนไทโคโปรตีน Ia ของเกล็ดเลือดเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะทำนายความรุนแรงการตีบของหลอดเลือดในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารีได้ *วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2556; 46(3): 273-284*

คำรหัส: โรคหลอดเลือดหัวใจ โพลีมอร์ฟิซึม ไกลโคโปรตีน Ia

บทนำ

โรคหลอดเลือดแดงโคโรนารี (coronary artery disease; CAD) เป็นโรคที่เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของประชากรทั่วโลก¹ และเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ ในประชากรไทย² CAD เป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกันทั้งที่เป็นและไม่เป็นพันธุกรรม ได้แก่ อายุ เพศ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วน กลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndromes) และการสูบบุหรี่ โดยปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ผนังหลอดเลือด ทำให้มีการอักเสบเกิดขึ้นและนำไปสู่การสะสมของไขมันและเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในผนังหลอดเลือดทำให้เกิดภาวะผนังหลอดเลือดแดงแข็ง หรือที่เรียกว่า atherosclerosis³ ซึ่งเกล็ดเลือดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเกิด atherosclerosis และ atherothrombosis โดยมีการเกาะติด เกาะกลุ่ม และหลังสารของเกล็ดเลือดเกิดขึ้น บทบาทดังกล่าวเกี่ยวข้องกับไกลโคโปรตีน (glycoprotein; GP) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับต่อตัวกระตุ้นต่างๆ โดย GPIa/IIa (integrin $\alpha_2\beta_1$) เป็นตัวรับของคอลลาเจน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับคอลลาเจนในผนังของหลอดเลือดที่มีการฉีกขาด มีโครงสร้างเป็น heterodimer ประกอบด้วย α_2 subunit (GPIa) และ β_1 subunit (GPIIa) มีรายงานว่าโพลีเมอร์พิซึมชนิด C807T/G873A ของจีน GPIa ของเกล็ดเลือด เป็นปัจจัยทางพันธุกรรมอย่างหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนของ CAD^{4,5} โดยโพลีเมอร์พิซึมดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ GPIa/IIa บนผิวของเกล็ดเลือด พบว่าผู้ที่มียาลลีล 807T/873A จะมีปริมาณของ GPIa/IIa มากกว่าผู้ที่มียาลลีล 807C/873G⁶ ซึ่งปริมาณของ GPIa/IIa ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกล็ดเลือดจับกับคอลลาเจนได้มากขึ้น ดังนั้นยาลลีล 807T/873A จึงมีความสัมพันธ์กับภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด (thrombosis) และการตีบแคบของหลอดเลือด ดังที่ได้มีการศึกษามาแล้วในกลุ่มผู้ป่วย acute coronary syndrome (ACS)^{5,7} ซึ่งจัดเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันจากการแตกของ atherosclerotic plaque แล้วเกิดกระบวนการสร้างลิ่มเลือดขึ้นมาอุดตันภายในหลอดเลือดหัวใจ โดย Zhao และคณะ⁵ พบว่าผู้ป่วย unstable angina pectoris ที่มีจีโนไทป์ TC ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยคอลลาเจนได้เร็วกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ CC จึงอาจกล่าวได้ว่า โพลีเมอร์พิซึม GPIa C807T/G873A อาจมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของ unstable angina pectoris ซึ่งในการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของโพลีเมอร์พิซึมนี้กับผู้ป่วย CAD ที่ยังไม่มีอาการของ ACS

stable angina pectoris จัดเป็น CAD ที่ยังไม่แสดงอาการของ ACS การดำเนินโรคอาจไม่ได้เกิดจากการสะสมของไขมันและเซลล์อักเสบต่าง ๆ ในผนังหลอดเลือดเท่านั้น แต่อาจเกิดจากภาวะที่มีการแตกของ atherosclerotic plaque โดยที่ผู้ป่วยไม่แสดงอาการ (silent plaque rupture) โดยหลังจากเกิดการแตกของ plaque แล้วจะเกิดลิ่มเลือดอยู่บน plaque ต่อมาจะมีการละลายลิ่มเลือดและตามด้วยการซ่อมแซมโดยการแบ่งตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบและเคลื่อนที่ขึ้นมาเพื่อสร้างส่วนที่หุ้ม plaque ไว้ (fibrous cap) จากการซ่อมแซมดังกล่าวมีผลต่อการเพิ่มขนาดของ plaque และการตีบของหลอดเลือด^{8,9} โดยปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และกลุ่มอาการเมแทบอลิก มีผลทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการแตกของ plaque ดังนั้นการเกิดอาการแทรกซ้อนของ CAD หรือมีการตีบของหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้นนั้น อาจมีหลายปัจจัยร่วมกันทั้งที่มาจากสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรม โดยผู้ที่มีการแตกของ plaque บ่อยครั้งประกอบกับมีภาวะเลือดมีการแข็งตัวง่ายกว่าปกติ (hypercoagulable state) โดยเฉพาะเกล็ดเลือดที่ทำงานมากผิดปกติจะมีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการเกิด atherosclerosis การเกิดลิ่มเลือดเมื่อเกิดการแตกของ plaque ซึ่งอาจจะมีผลต่อการตีบแคบของหลอดเลือดหัวใจได้ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีเมอร์พิซึม C807T/G873A ของจีน GPIa ของเกล็ดเลือดกับการตีบของหลอดเลือดหัวใจในผู้ป่วยที่มีการตีบของหลอดเลือดจาก atherosclerotic plaque ที่ยังไม่แสดงอาการของ ACS ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งชี้เพื่อทำนายความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการได้

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาควิชาโรคหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น ด้วยอาการเจ็บหน้าอกที่เข้าข่ายโรคหลอดเลือดหัวใจและได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้ชำนาญการโรคหัวใจว่ามีการตีบของหลอดเลือดหัวใจ จาก atherosclerotic plaque จากผลการบันทึกภาพหลอดเลือดหัวใจด้วยรังสีเพื่อประเมินการตีบของหลอดเลือดหัวใจ (coronary angiography) จำนวน 212 ราย ประกอบด้วยเพศชาย 143 ราย และเพศหญิง 69 ราย มีอายุเฉลี่ย 61.9 ปี ซึ่งอาสาสมัครทุกรายต้องไม่มีอาการของโรคหัวใจ โรคหัวใจวาย โรคตับ โรคไต โรคเมเร็ง หรือภาวะอักเสบอื่นๆ

ความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดหัวใจ ประเมินโดยค่า Gensini score ซึ่งคำนวณจากร้อยละการตีบของหลอดเลือดและตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพ¹⁰ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้แบ่งอาสาสมัครจากค่า Gensini score ออกเป็นสองกลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มีค่า Gensini score ≥ 30 และกลุ่มที่มีค่า Gensini score < 30 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดหัวใจรุนแรงและไม่รุนแรงตามลำดับ¹¹ และเนื่องจากการพิจารณาความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดหัวใจ สามารถประเมินได้จากจำนวนของหลอดเลือดหัวใจหลักสี่เส้น (left main, left anterior descending, left circumflex และ right coronary artery) ที่ตีบมากกว่าร้อยละ 50 งานวิจัยนี้จึงได้แบ่งกลุ่มอาสาสมัครตามจำนวนหลอดเลือดหัวใจที่ตีบด้วย

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE510414 โดยอาสาสมัครทุกรายได้รับการชี้แจงเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการวิจัยจากคณะผู้วิจัยและลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ

2. การตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีน GPIa

เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Flexi Gene DNA kits (QIAGEN, Germany) ควบคุมความเข้มข้นของดีเอ็นเอทุกรายเป็น 100 ng/ μ L เพื่อใช้สำหรับตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีน GPIa ของเกล็ดเลือดด้วยวิธี multiplex allele specific polymerase chain reaction (ASPCR) โดยแบ่งการตรวจออกเป็น 2 ปฏิกริยา¹² ซึ่งปฏิกริยาที่ 1 เป็นการตรวจหาอัลลีล 807T หรือ 873G ใช้ primer (Pacific science, Thailand) และสารต่าง ๆ ดังนี้ คือ forward primer ที่จำเพาะกับอัลลีล 807T (5' ATG GTG GGG ACC TCA CAA ACA CAT AT 3') 187 ng, forward primer ที่จำเพาะกับอัลลีล 873G (5' GGT GGG CGA CGA AGT GCT AGG 3') 125 ng, common reverse primer สำหรับอัลลีล 807C และ 807T (5' GAT TTA ACT TTC CCA GCT GCC TTC 3') 125 ng และ common reverse primer สำหรับอัลลีล 873G และ 873A (5' CTC AGT ATA TTG TCA TGG TTG CAT TG 3') 125 ng ดีเอ็นเอ 100 ng, dNTPs ความเข้มข้น 200 μ M (Promega, USA), 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCL pH 8.4, 50 mM KCl), $MgCl_2$ เข้มข้น 2 mM (Invitrogen, Brazil) และ Taq polymerase 0.5 unit (Invitrogen, Brazil) ส่วนปฏิกริยาที่ 2 เป็นการตรวจหาอัลลีล

807C หรือ 873A โดยใช้ primer และสารต่าง ๆ เหมือนกับปฏิกริยาที่ 1 ยกเว้น forward primer ที่จำเพาะกับอัลลีล 807C (5' GTG GGG ACC TCA CAA ACA CATGC 3') 125 ng และ forward primer ที่จำเพาะกับอัลลีล 873A (5' GGT GGG CGA CGA AGT GCT AGA 3') 187 ng โดยส่วนผสมในปฏิกริยา PCR มีปริมาตรรวม 25 μ L จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง thermal cycler (Gene Technologies, England) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที หลังจากนั้นทำ PCR 35 รอบ ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่ 94 °C 20 วินาที annealing ที่ 59 °C 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C 30 วินาที โดยในขั้นตอนสุดท้ายเป็น final extension ที่ 72 °C เป็นระยะเวลา 4 นาที 30 วินาที ซึ่งในแต่ละครั้งของการทำ PCR จะทำ no template control โดยการเติมน้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel (ISCBio-Express, USA) ที่มีความเข้มข้น 2.0% ซึ่งมีส่วนผสมของ ethidium bromide (Promega, USA) ความเข้มข้น 0.4 μ g/mL ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ที่ 100 mV เป็นเวลา 60 นาที และตรวจสอบผลที่ได้ด้วย UV transilluminator (Dolphin-DOC; Wealtec, USA) แปลผลจีโนไทป์จากขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 232 และ 113 bp สำหรับอัลลีล 807C/807T และ 873G/873A ตามลำดับ ซึ่งผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ 807CC/873GG จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 113 bp และ 232 bp ในปฏิกริยาที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ 807CT/873GA จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 113 bp และ 232 bp ในทั้งสองปฏิกริยา และผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ 807TT/873AA จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 232 bp และ 113 bp ในปฏิกริยาที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (รูปที่ 1)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version¹⁷ (SPSS Inc., USA) ทดสอบว่าข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติหรือไม่ด้วยสถิติ Kolmogorov-Smirnov test หากข้อมูลมีการกระจายไม่เป็นแบบปกติ ($p < 0.05$) จะแปลงข้อมูลเป็นค่า log¹⁰ จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่เป็นค่าต่อเนื่องระหว่างสองกลุ่มด้วยสถิติ Student's t-test หากกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนมากกว่าสองกลุ่มวิเคราะห์ด้วยสถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) สำหรับข้อมูลเชิงกลุ่ม วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Chi-square โดยมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

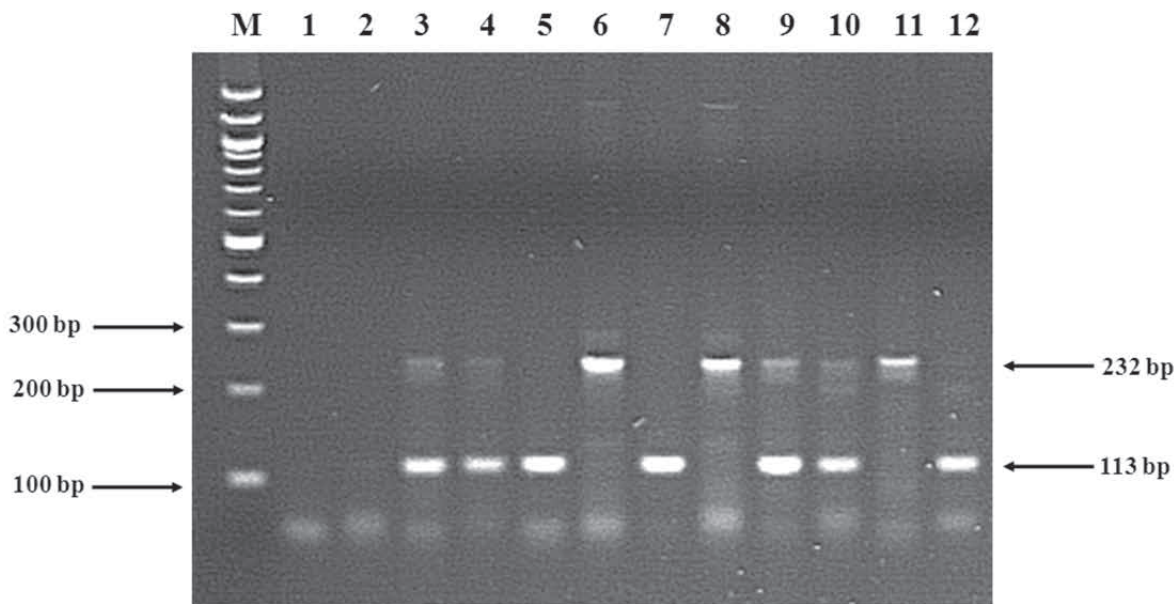


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the platelet GPIa C807T/G873A gene polymorphisms using ASPCR. Two PCR reactions using forward primer specific for 807T/873G and 807C/873A alleles in reaction 1 and 2, respectively. The 232 and 113 bp fragments are the PCR products of 807C/807T and 873G/873A alleles respectively. M = 100 bp ladder, lane 1, 3, 5, 7, 9, 11 = reaction 1 (specific primer for 807T and 873G allele) lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, = reaction 2 (specific primer for 807C and 873A alleles), lane 1 and 2 = no template control, lane 5+6 and 7+8 = 807CC/873GG homozygote, lane 3+4 and 9+10 = 807CT/873GA heterozygote, lane 11+12 = 807TT/873AA homozygote

ผลการศึกษา

ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครได้สรุปไว้ในตารางที่ 1 โดยกลุ่มอาสาสมัครที่มีค่า Gensini score ≥ 30 มีสัดส่วนผู้สูบบุหรี่มากกว่ากลุ่มที่มีค่า Gensini score < 30 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีระดับ HDL-C ต่ำกว่ากลุ่มที่มีค่า Gensini score < 30 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการตรวจโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีน GPIa ของเกล็ดเลือด พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ 807CC/873GG, 807CT/873GA และ 807TT/873AA ในอาสาสมัครทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 56.6, 37.3 และ 6.1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตาม Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) เมื่อแบ่งกลุ่มอาสาสมัครเป็น 2 กลุ่มจากค่า Gensini score ได้แก่กลุ่มที่มี Gensini score ≥ 30 และกลุ่มที่มี Gensini score < 30 พบว่าความถี่จีโนไทป์ของ 807CC/873GG, 807CT/873GA และ 807TT/873AA ระหว่างอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่า Gensini score ในแต่ละจีโนไทป์ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อแบ่งกลุ่มอาสาสมัครตามจำนวนหลอดเลือดที่ตีบมากกว่า

ร้อยละ 50 พบว่าความถี่จีโนไทป์ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครทั้ง 4 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 4)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

GPIa เป็นไกลโคโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม $\beta 1$ integrin โดยเป็นตัวรับของคอลลาเจน ซึ่งทำให้เกิดการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับผนังหลอดเลือดที่มีการฉีกขาด มีรายงานว่าโพลีมอร์ฟิซึมของจีน GPIa ชนิด C807T และ G873A มีความสัมพันธ์กับปริมาณ GPIa ที่เพิ่มขึ้นบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด ทำให้สามารถจับกับคอลลาเจนได้มากขึ้น โดยโพลีมอร์ฟิซึมทั้งสองนี้จะถ่ายทอดไปด้วยกันเสมอ (complete linkage disequilibrium)¹³ นอกจากนี้ยังมีโพลีมอร์ฟิซึมที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันอีกหนึ่งชนิด คือ *Bgl* II restriction fragment length polymorphism กล่าวคือ *Bgl* II (+) จะถ่ายทอดไปกับอัลลีล 807T และ 873A ในขณะที่ *Bgl* II (-) จะถ่ายทอดไปกับอัลลีล 807C และ 873G¹⁴ ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจโพลีมอร์ฟิซึม GPIa C807T และ G873A เพราะเมื่อตรวจด้วยเทคนิค ASPCR โดยใช้ forward primer ที่จำเพาะกับอัลลีลที่พบบ่อยของ C807T (อัลลีล 807C) กับ forward

primer ที่จำเพาะกับอัลลีลที่มีการเปลี่ยนแปลงของ G873A (อัลลีล 873A) ในปฏิกิริยาเดียวกัน สามารถใช้เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา PCR (internal control) ได้โดยไม่ต้องใช้จีนควบคุม (housekeeping gene) เช่น β -actin

กลุ่มผู้ป่วยในการศึกษานี้คือ ผู้ที่มี atherosclerotic plaque ภายในหลอดเลือดหัวใจ แต่ยังไม่แสดงอาการของ ACS ซึ่งในผู้ป่วยเหล่านี้ อาจมีการแตกของ plaque แต่ไม่แสดงอาการ¹⁵ ในกรณีนี้ จะมีการซ่อมแซมหลอดเลือดเกิดขึ้น ประกอบกับมีภาวะเลือดมีการแข็งตัวง่ายกว่าปกติ เช่น ในกรณีที่เกิดเลือดมีการทำหน้าที่มากกว่าปกติ อาจจะมีผลต่อการดำเนินของการตีบแคบของหลอดเลือดหัวใจ และทำให้หลอดเลือดมีการตีบแคบมากขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีน GPIa ของเกล็ดเลือดในผู้ป่วย พบว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ 807CC/873GG, 807CT/873GA และ 807TT/873AA เท่ากับร้อยละ 56.6, 37.3 และ 6.1 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับความถี่จีโนไทป์ในคนปกติของไทย ซึ่งทำการศึกษาโดยนันทรัตน์ โสมานะสิน และคณะ ซึ่งมีความถี่จีโนไทป์ เท่ากับร้อยละ 58.3, 33.0 และ 8.7 ตามลำดับ (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกับความถี่จีโนไทป์ที่พบในคนปกติชาวเกาหลี¹² และผู้ป่วย unstable angina pectoris ชาวจีน⁵ แต่แตกต่างจากคนปกติที่เป็นชาวคอเคเซียน อินเดีย ฮิสแปนิก (Hispanic)¹² และกรีซ¹⁶ ดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อชาติเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความถี่จีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดในผู้ป่วย โดยพิจารณาจากค่า Gensini score พบว่าความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี Gensini score ≥ 30 และ < 30 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเนื่องจากการพิจารณาความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดหัวใจสามารถพิจารณาจากจำนวนหลอดเลือดหัวใจที่ตีบ งานวิจัยนี้จึงได้แบ่งกลุ่มอาสาสมัครตามจำนวนหลอดเลือดหัวใจที่ตีบ พบว่าความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มอาสาสมัครแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จะเห็นได้ว่าแม้ว่าจะใช้เกณฑ์การพิจารณาความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดที่แตกต่างกัน ก็ยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมกับความรุนแรงของโรค ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าโพลีมอร์ฟิซึม C807T/

G873A ของจีน GPIa เพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถที่จะใช้ทำนายความรุนแรงการตีบของหลอดเลือดในผู้ป่วยได้ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดและแตกของ plaque นอกเหนือจาก GPIa/IIa บนเมมเบรนของเกล็ดเลือด ซึ่งทีมงานวิจัยที่รายงานความสัมพันธ์ของกระบวนการดังกล่าวกับโพลีมอร์ฟิซึมอื่นๆ ของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการห้ามเลือด ได้แก่ โพลีมอร์ฟิซึมของตัวรับบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด ได้แก่ GPIIa Leu33Pro¹⁷, GPIb Thr145Met และ variable number of tandem repeat (VNTR)¹⁸ โพลีมอร์ฟิซึมของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ factor V Arg506Gln¹⁹, prothrombin G20210A²⁰ และ fibrinogen Bcl I²¹ เป็นต้น สำหรับโพลีมอร์ฟิซึมที่เกี่ยวข้องกับการละลายลิ่มเลือด เช่น plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G²² และ thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) Thr325Ile²³ เป็นต้น ดังนั้นหากมีการศึกษาโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่เกี่ยวข้องหลายๆ จีน แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype กับความตีบของหลอดเลือด อาจเป็นตัวบ่งชี้การทำนายพัฒนาการของโรคในผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการได้

ผลการศึกษาอาจแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม C807T/G873A ของจีน GPIa ของเกล็ดเลือดเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการประเมินความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือดในผู้ป่วย ควรมีการศึกษาโพลีมอร์ฟิซึมของจีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการห้ามเลือดที่มีผลทำให้เลือดมีการแข็งตัวง่ายกว่าปกติ แล้วศึกษาเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype กับความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือด อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับจำนวนของผู้ป่วยที่มีการตีบของหลอดเลือดจำนวน 0 และ 4 เส้น ซึ่งมีเพียง 24 และ 14 ราย ทำให้พบความถี่ของอัลลีล 807T/873A ค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อวิเคราะห์โดยรวมกลุ่มผู้ป่วยเป็นผู้ที่มีหลอดเลือดตีบ 2, 3 และ 4 เส้นเป็นกลุ่มเดียวกันก็ยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมกับความรุนแรงของการตีบของหลอดเลือด

Table 1 Demographic data and characteristics of the study subjects

Parameters	Gensini score ≥ 30 (n=117)	Gensini score <30 (n=95)	p-value
Age (years)	62.0 $\pm$ 9.1	61.6 $\pm$ 8.7	0.755 ^c
Gender (Male:Female)	79:38	64:31	0.981 ^b
Diabetes mellitus, n (%)	43 (36.8)	32 (33.7)	0.642 ^b
Hypertension, n (%)	103 (88.0)	75 (78.9)	0.073 ^b
Dyslipidemia, n (%)	113 (96.6)	89 (93.7)	0.322 ^b
Smoking, n (%)	51 (43.6)	26 (27.7)	0.017 ^b
Obesity, n (%)	53 (45.3)	42 (44.7)	0.929 ^b
Metabolic syndrome, n (%)	73 (72.3)	52 (64.2)	0.243 ^b
BMI (kg/m ²)	24.9 $\pm$ 3.3	24.8 $\pm$ 4.2	0.784 ^c
SBP (mmHg)	129.9 $\pm$ 17.9	132.8 $\pm$ 17.7	0.250 ^c
DBP (mmHg)	73.3 $\pm$ 12.5	75.1 $\pm$ 10.2	0.268 ^c
TC (mg/dL)	181.3 $\pm$ 55.0	176.9 $\pm$ 43.8	0.528 ^c
TG ^a (mg/dL)	173.3 $\pm$ 1.7	157.9 $\pm$ 1.7	0.268 ^c
LDL-C (mg/dL)	104.3 $\pm$ 44.0	101.2 $\pm$ 35.0	0.568 ^c
HDL-C ^a (mg/dL)	36.6 $\pm$ 1.3	39.8 $\pm$ 1.3	0.021 ^c
FBS ^a (mg/dL)	107.4 $\pm$ 1.4	113.7 $\pm$ 1.4	0.763 ^c
hs-CRP ^a (mg/L)	2.0 $\pm$ 3.6	1.7 $\pm$ 4.2	0.344 ^c

Continuous values are expressed as mean $\pm$ SD, a: Values are shown as geometric mean $\pm$ SD

^b and ^c: Statistical comparison by Chi-square and Student's t-test respectively

BMI: body mass index, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, TC: total cholesterol, TG: triglyceride, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, FBS: fasting blood sugar, hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein

Table 2 Genotype distributions of the platelet GPIa C807T/G873A gene polymorphisms in subjects with Gensini score ≥ 30 and < 30

Polymorphisms	Gensini score ≥ 30 (n=117)	Gensini score < 30 (n=95)	p-value ^a
Genotype, n (%)			
807CC/873GG	68 (58.1)	52 (54.7)	0.453
807CT/873GA	44 (37.6)	35 (36.8)	
807TT/873AA	5 (4.3)	8 (8.4)	
807T/873A carrier (807CT/873GA+807TT/873AA)	49 (41.9)	43 (45.3)	0.621
Allele frequencies (%)			
807C/873G allele	76.9	73.2	0.193
807T/873A allele	23.1	26.8	

^a: Statistical comparison by Chi-square**Table 3** Gensini score in subjects with each genotype of the platelet GPIa C807T/G873A gene polymorphisms

Genotypes	Gensini score	p-value
807CC/873GG, (n=120)	22.4 $\pm$ 33.4	0.314 ^a
807CT/873GA, (n=79)	28.2 $\pm$ 30.8	
807TT/873AA, (n=13)	19.25 $\pm$ 51.3	
807T/873A carriers, (n=92) (807CT/873GA+807TT/873AA)	26.7 $\pm$ 34.1	0.272 ^b

^a: compared among each genotype by one-way analysis of variance (ANOVA)^b: compared between 807T/873A carrier (807CT/873GA+807TT/873AA) and 807CC/873GG genotype by Student's t-test

Table 4 Genotype distributions of the platelet GPIa C807T/G873A gene polymorphisms in subjects which were subdivided by number of stenosed vessels

Number of vascular stenosis	807CC/873GG (n=120)	807CT/873GA (n=79)	807TT/873AA (n=13)	p-value ^a
0 vessel, n (%)	17 (68.0)	5 (20.0)	3 (12.0)	0.741
1 vessel, n (%)	28 (51.9)	23 (42.6)	3 (5.6)	
2 vessel, n (%)	40 (61.5)	22 (33.8)	3 (4.6)	
3 vessel, n (%)	28 (50.0)	23 (42.6)	4 (7.4)	
4 vessel, n (%)	7 (50.0)	6 (42.9)	1 (7.1)	

^a: Statistical comparison by Chi-square**Table 5** The genotype and allele frequencies of the platelet GPIa C807T/G873A gene polymorphisms in each ethnic group

Populations (n)	807CC/873GG (%)	807CT/873GA (%)	807TT/873AA (%)	References
Caucasians (2957) ^a	36	49	15	12
Hispanics (92) ^a	26	47	27	12
Asian Indians (95) ^a	38	47	15	12
Koreans (103) ^a	50	40	10	12
Greece (232) ^a	37	55	8	16
Chinese (34) ^b	55	45	0	5
Thai (112) ^a	53	40	7	(unpublished data)
Thai (212)	57	37	6	Present study

^a: frequency in normal population^b: frequency in patients with unstable angina pectoris

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่เข้าร่วมโครงการ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดและวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด และขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนครุภัณฑ์ อุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ทุนอุดหนุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่นสำหรับงบประมาณในการทำวิจัย และทุนการศึกษาจากกลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125(1): e2-220
2. Kiatchoosakun S, Sutra S, Thepsuthammarat K. Coronary artery disease in the Thai population: data from health situation analysis 2010. *J Med Assoc Thai* 2012; 95 Suppl 7: S149-55
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-95
4. Ogawa N, Imai Y, Morita H, Nagai R. Genome-wide association study of coronary artery disease. *Int J Hypertens* 2010; 2010: doi:10.4061/2010/790539
5. Zhao YH, Xu Y, Gu YY, Li Y, Zhang JY, Su X. Functional effect of platelet membrane glycoprotein Ia gene polymorphism in the pathogenesis of unstable angina pectoris. *J Int Med Res* 2011; 39(2): 541-8
6. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood* 1997; 89(6): 1939-43
7. Roest M, Banga JD, Grobbee DE, de Groot PG, Sixma JJ, Tempelman MJ, et al. Homozygosity for 807 T polymorphism in alpha(2) subunit of platelet alpha(2)beta(1) is associated with increased risk of cardiovascular mortality in high-risk women. *Circulation* 2000; 102(14): 1645-50
8. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2(5): 422-9
9. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart* 1999; 82(3): 265-8
10. Ling S, Shu-zheng L. Association between non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease severity. *Chin Med J* 2011; 124(6): 867-72
11. Rassoul F, Richter V, Hentschel B, Geisel J, Herrmann W, Kuntze T. Plasma homocysteine levels & 677C-->T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res* 2008; 127(2): 154-8
12. Dinan DM, Friedman KD, Hessner MJ. Allelic distribution of the glycoprotein Ia (alpha2-integrin) C807T/G873A dimorphisms among caucasian venous thrombosis patients and six racial groups. *Br J Haematol* 1999; 107(3): 563-5
13. Casorelli I, De Stefano V, Leone AM, Chiusolo P, Burzotta F, Paciaroni K, et al. The C807T/G873A polymorphism in the platelet glycoprotein Ia gene and the risk of acute coronary syndrome in the Italian population. *Br J Haematol* 2001; 114(1): 150-4
14. Matsubara Y, Murata M, Maruyama T, Handa M, Yamagata N, Watanabe G, et al. Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha2beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood* 2000; 95(5): 1560-4

15. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001; 103(7): 934-40
16. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Stefanadi E, Marinou K, Stefanadis C. Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and the risk for premature myocardial infarction: effects on the release of sCD40L during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(10): 1959-66
17. Grove EL, Orntoft TF, Lassen JF, Jensen HK, Kristensen SD. The platelet polymorphism PIA2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J Intern Med* 2004; 255(6): 637-44
18. Jussi M, Markus P, Antti P, Pekka K. Platelet glycoprotein Iba HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Circulation* 1998; 104(8): 876-80
19. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT Jr, et al. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 89(8): 2817-21
20. Franco RF, Trip MD, ten Cate H, van den Ende A, Prins MH, Kastelein JJ, et al. The 20210 G-->A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1999; 104(1): 50-4
21. Zito F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Donati MB, Iacoviello L. Bcl I polymorphism in the fibrinogen beta-chain gene is associated with the risk of familial myocardial infarction by increasing plasma fibrinogen levels. A case-control study in a sample of GISSI-2 patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(12): 3489-94
22. Isordia-Salas I, Leanos-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sanchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62(4): 365-72
23. Kamal HM, Ahmed AS, Fawzy MS, Mohamed FA, Elbaz AA. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels and Thr325Ile polymorphism as a risk marker of myocardial infarction in Egyptian patients. *Acta Cardiol* 2011; 66(4): 483-8

