รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระดับของปัจจัยการห้ามเลือดที่สัมพันธ์กับการทำงานผิดปกติของ
เซลล์เอนโดทีเลียมและจีนที่เกี่ยวข้องในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ
Levels of haemostatic factors associated with endothelial dysfunction and related genes in patients with coronary artery disease

ภายใต้ชุดโครงการ

ระดับของตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีในเลือดและปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลต่อ
ความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ
Blood biochemical markers and genetic factors on vascular endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease

หัวหน้าโครงการวิจัย
รศ. ดร. นันทรัตน์ โฆมานะสิน

คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการทุกท่าน และเป็นส่วนสำคัญทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณแพทย์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ และบุคลากรอื่น ๆ ของศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มีส่วนเกี่ยวข้องเกี่ยวข้องในการให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บสิ่งส่งตรวจและข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาสาสมัครในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2554 ซึ่งเป็นโครงการปีที่ 3 ของโครงการต่อเนื่อง 3 ปี เพื่อดำเนินการศึกษาวิจัยในอาสาสมัคร คณะผู้วิจัยหวังว่ารายงานการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ด้านสุขภาพของปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของไทยในปัจจุบัน

รศ.ดร.นันทรัตน์ โฆมานะสิน

สิงหาคม 2555

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... 2

สารบัญ..... 3

สารบัญตาราง..... 4

สารบัญรูป..... 5

บทคัดย่อ 6

Abstract 7

บทนำ.....8

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 8

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....10

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย.....10

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 10

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 11

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 12

วิธีการดำเนินการวิจัย.....12

ผลการศึกษา.....19

วิจารณ์ผลการศึกษา..... 24

เอกสารอ้างอิง..... 26

ภาคผนวก (คณะผู้วิจัย) 31

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

Table 1: Demographic data and biochemical variables in subjects with CAD and without CAD (non-CAD) …….. 20

Table 2: TM G33A polymorphism in patients with CAD compared to non-CAD group ……. 21

Table 3: Association of TM G33A polymorphism with traditional risk factors for CAD …… 21

Table 4: The association of TM G33A polymorphism with the number of coronary vessel disease in subjects who undergoing coronary angiogram ……. 22

Table 5: Plasma TM levels in subjects possessed each genotype of the TM G-33A polymorphism ……. 22

Table 6: Plasma TM levels in subjects with each traditional risk factors for CAD ……. 23

Table 7: Correlations between TM levels and risk factors for CAD ……. 23

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

Fig. 1: Amplified PCR products on 2% agarose gel for detection the TM G33A polymorphism. The size of the products is 260 bp. 17

Fig. 2: Agarose gel shows digested PCR products by 2 units of *Stu*I restriction enzyme for detection of the TM G33A polymorphism..... 17

บทคัดย่อ

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) เป็นโรคที่พบมากขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศไทย และเป็นสาเหตุที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตมากเป็นอันดับสองรองจากการประสบอุบัติเหตุ ซึ่งการทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมที่บุผนังหลอดเลือดมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิพยาธิสรีรวิทยาของ CAD การตรวจวัดตัวบ่งชี้ต่าง ๆ ของการทำหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมรวมทั้งการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่เกี่ยวข้องจึงมีความสำคัญในการทำนายความรุนแรงของโรค งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาในผู้ป่วย CAD ที่ได้รับการตรวจวิวินิจฉัยด้วยการทำ coronary angiography จำนวน 189 ราย และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็น CAD จำนวน 138 ราย โดยตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม TM G-33A ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism และตรวจวัดปริมาณของทรอมโบโมดูลินในพลาสมาด้วยวิธี in-house sandwich ELISA ผลการศึกษาพบว่าความถี่จีโนไทป์ GG และ GA+AAของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมเท่ากับ 92.1 vs. 92.5 และ 7.9 vs.7.5% ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.910) สำหรับระดับของทรอมโบโมดูลินในผู้ป่วย CAD และกลุ่มควบคุม พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (3.2$\pm$1.3 และ 3.0$\pm$1.4 ng/ml ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์ระดับของทรอมโบโมดูลินในกลุ่มตัวอย่างโดยแยกตามจีโนไทป์ก็พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (GG=3.1$\pm$1.3 และ GA+AA=3.3+1.6 ng/ml, p=0.685) แต่เมื่อวิเคราะห์แยกตามปัจจัยเสี่ยงพบว่ากลุ่มผู้ที่เป็นเบาหวานมีระดับของทรอมโบโมดูลินในพลาสมาสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือด ในขณะที่มีความสัมพันธ์กับอายุ ความดันโลหิตขณะที่หัวใจบีบตัว ไตรกลีเซอร์ไรด์ และ high density lipoprotein-cholesterol ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าระดับของทรอมโบโมดูลินในพลาสมาระหว่างผู้ป่วย CAD และกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD ซึ่งอาจใช้ในการพยากรณ์ภาวะแทรกซ้อนที่จะเกิดในผู้ป่วยได้

คำสำคัญ : โรคหลอดเลือดหัวใจ ทรอมโบโมดูลิน โพลีมอร์ฟิซึม

Abstract

The incidence of coronary artery disease (CAD) has been creasing in Thai population and is the second causes of death for Thai people. Endothelial dysfunction plays a crucial role in the pathophysiology of CAD. Therefore, plasma levels of thrombomodulin as well as thrombomodulin G-33A polymorphism could serve as biomarkers of endothelial damage for prediction of CAD outcome. The present study was conducted to examine the association of those parameters with CAD by measuring the levels of plasma soluble thrombomodulin and G-33A polymorphism using sandwich ELISA and polymerase chain reaction-fragment length polymorphism techniques, respectively. Blood samples were collected from 189 patients with CAD diagnosed by coronary angiography and 138 subjects without CAD. The results revealed that genotype frequencies of G-33A polymorphism showed no significant difference between patients and controls (GG, GA+AA = 92.1 vs. 92.5 and 7.9 vs.7.5%, respectively). There was no significant difference of the levels of soluble thrombomodulin between patients with CAD and controls (3.2$\pm$1.3 and 3.0$\pm$1.4 ng/ml respectively). In addition, the levels did not significantly differ between genotypes GG and GA+AA (3.1$\pm$1.3 and GA+AA=3.3+1.6 ng/ml respectively, p=0.685). However, a significant increase in plasma soluble thrombomodulin was found in individuals with diabetes mellitus (DM) compared to those without DM. In contrast, a correlation between the thrombomodulin levels and fasting blood sugar was not demonstrated whereas the relationships were found with age, systolic blood pressure, triglyceride and high density lipoprotein-cholesterol. These results suggest that although the levels of soluble thrombomodulin were not significantly different between patients with CAD and controls, the relationships with the other traditional risk factors for CAD were demonstrated. Thus, plasma thrombomodulin levels might serve as a predictor marker for the complication in the patients.

Keywords: coronary artery disease, thrombomodulin, polymorphism

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรในแถบประเทศตะวันตก [1] ซึ่งโรคนี้เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน (multifactorial disease) ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ผนังหลอดเลือดโดยเริ่มจากการมีภาวะผนังหลอดเลือดแข็งหรือ atherosclerosis และเมื่อมีการฉีกขาดของ atherosclerotic plaque ก็จะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด (thrombosis) อันนำไปสู่พยาธิสภาพต่างๆของ CAD ได้แก่ angina pectoris, myocardial infarction, cerebral ischaemia และ peripheral artery disease ซึ่งปัจจัยที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นได้ทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม (environmental factors) และปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factors) ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ ได้แก่ การมีระดับไขมันในเลือดสูง [total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) หรือ triglycerides (TG)] การสูบบุหรี่ ความดันโลหิตสูง ความเครียด การรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง และการขาดการออกกำลังกาย เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ควบคุมได้ ซึ่งหากสามารถปรับเปลี่ยนปัจจัยเหล่านี้ได้ก็จะทำให้มีอาการแสดงของโรคช้าลง หรืออาจป้องกันความรุนแรงที่จะเกิดขึ้นได้ ในขณะที่ปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ และเกี่ยวข้องกับจีน (gene) ที่ควบคุมเกี่ยวกับเมแทบอลิซึม (metabolism) ของไขมัน homocysteine เอนไซม์ และสารที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress และกระบวนการทำให้เกิดลิ่มเลือดที่ผนังของหลอดเลือด[2-4] จากรายงานทางระบาดวิทยาพบว่าอุบัติการณ์ของ CAD สูงในประเทศทางยุโรปเหนือและอเมริกาเหนือ และมีอุบัติการณ์ต่ำในประเทศแถบตะวันออก เช่น จีน และญี่ปุ่น[5] แต่อย่างไรก็ตามในยุคโลกไร้พรมแดนพบว่า ในประเทศแถบตะวันออกมีอุบัติการณ์การเกิด CAD สูงขึ้น สำหรับอุบัติการณ์ในประเทศไทยยังไม่มีรายงาน แต่จากสถิติกระทรวงสาธารณสุขปี 2545 พบว่าโรคหลอดเลือดและหัวใจเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 4 ของคนไทย และนับวันก็จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้รัฐต้องใช้งบประมาณจำนวนมากในการดูแลและรักษาผู้ป่วย ดังนั้นหากแพทย์สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยได้แต่เนิ่น ๆ ก็จะสามารถวางแผนการรักษาและให้คำแนะนำเพื่อป้องกันอาการทางคลินิกที่รุนแรงของโรคที่อาจนำไปสู่ความพิการหรือเสียชีวิตได้ ซึ่งนอกจากจะเป็นการประหยัดงบประมาณในการดูแลผู้ป่วยพิการแล้ว ยังเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรให้อยู่ในสังคมได้อย่างมีความสุข

Atherosclerosis เป็นสาเหตุชักนำสำคัญในการทำให้เกิด CAD ในปัจจุบันเชื่อว่าการอักเสบเป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำให้เกิด atherosclerosis ที่ผนังของหลอดเลือด ซึ่งมีผลทำให้เซลล์เอนโดทีเลียมที่บุผนังหลอดเลือดมีความผิดปกติและเกิดขึ้นเป็นเวลานานแล้วทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมผิดปกติ (endothelial dysfunction) ดังนั้นความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมจึงเป็นตัวบ่งชี้ระยะแรกของ

การเกิด CAD กล่าวคือ เมื่อหลอดเลือดสัมผัสกับปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะมันในเลือดสูงผิดปกติ (dyslipidemia) ฮอร์โมนที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวและเกี่ยวข้องกับภาวะความดันโลหิตสูง ผลิตผลจากปฏิกิริยา glycooxidation ที่มีความสัมพันธ์กับภาวะ hyperglycemia สารที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokines) ซึ่งส่งผลให้เซลล์เอนโดทีเลียมทำหน้าที่ผิดปกติ โดยทำให้มีการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด (adhesion molecules) บนผิวของเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น มีการปล่อยสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิ่มเลือด เช่น tissue factor และสารที่ยับยั้งการละลายลิ่มเลือด เช่น plaminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) เพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิด atherosclerosis บนผนังของหลอดเลือดแดง รวมทั้งการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือดซึ่งทำให้เกิดการแสดงอาการทางคลินิกของ CAD[6, 7] การประเมินความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมทำได้โดยการตรวจวัด flow-mediated dilatation หรือตรวจวัดปริมาณของตัวบ่งชี้ชนิดต่าง ๆ ในกระแสเลือด ซึ่งได้แก่สารที่สร้างโดยเซลล์เอนโดทีเลียม เช่น nitric oxide (NO) วอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ (von Wiilebrand factor; vWF) ทรอมโบโมดูลิน (thrombomodulin; TM) tissue-plasminogen activator (t-PA) PAI-1 และ endothelial cell microparticles (EMPs) ซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรนของเซลล์เอนโดทีเลียมที่ถูกปล่อยออกมาในขณะที่เซลล์เอนโดทีเลียมมีการฉีกขาด เป็นต้น ตรวจวัดปริมาณสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (proinflammatory substances) เช่น high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor alpha (TNF-α) เป็นต้น หรือตรวจวัดสารที่ก่อให้เกิด oxidative stress ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์เอนโดทีเลียมทำหน้าที่ผิดปกติ เช่น lipid peroxide, superoxide dimutase และ homocysteine เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่าตัวบ่งชี้ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมให้เกิดภาวะหลอดเลือดมีการอุดตันจากลิ่มเลือด (thrombogenesis) ในผู้ป่วย CAD[8-13] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของปัจจัยดังกล่าวข้างต้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด CAD เช่นกัน [14-20]

ในการวิจัยนี้จะทำการตรวจวัดตัวบ่งชี้ในเลือดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการห้ามเลือดที่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการทำงานผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียม ได้แก่ TM ที่เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการอักเสบซึ่งเกิดขึ้นที่ผนังหลอดเลือด ตัวบ่งชี้ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ในระยะแรกของการเกิด artherosclerosis และเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือดบนผนังของหลอดเลือดที่มี arthetosclerosis ซึ่งนำไปสู่อาการทางคลินิกของ CAD นอกจากนี้ยังจะศึกษาโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ TM ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่ไม่ถูกปรับเปลี่ยนโดยปัจจัยอื่น ซึ่งหากพบว่าตัวบ่งชี้เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการเกิด CAD ในคนไทย จะมีประโยชน์ต่อแพทย์ในการวางแผนการรักษาเพื่อป้องกันการเกิดโรคในผู้ที่มีโอกาสเสี่ยงซึ่งสามารถลดอุบัติการณ์ของโรคในอนาคตได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการเฝ้าระวังไม่ให้เกิดอาการซ้ำในผู้ป่วยที่เคยมีอาการ ซึ่งอาจนำไปสู่ความพิการ

และเสียชีวิตได้ แม้ว่ามีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของตัวบ่งชี้เหล่านี้กับ CAD ในต่างประเทศแล้ว แต่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทยมาก่อน และเนื่องจากการอุบัติการณ์ของ CAD มีความแตกต่างกันในระหว่างระหว่างเชื้อชาติ ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากความแตกต่างกันของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรม ซึ่งปัจจัยทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอาจมีผลทำให้การตอบสนองต่อปัจจัยเสี่ยงของคนแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกัน[5] ดังนั้นจึงยังเป็นข้อประเด็นที่น่าศึกษาวิจัยเพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการประเมินการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมจากการตรวจวัดเป็นตัวบ่งชี้ในเลือดของผู้ป่วยชาวไทยว่ามีความแตกต่างจากผู้ป่วยที่มีรายงานแล้วในต่างประเทศหรือไม่

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดปัจจัยการห้ามเลือดที่เป็นตัวบ่งชี้การทำงานผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียม ได้แก่ TM ในผู้ป่วย CAD เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็น CAD

2. เพื่อตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ TM ในผู้ป่วย CAD เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็น CAD

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ทำการตรวจวัดปัจจัยการห้ามเลือดที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำงานผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมและโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่เกี่ยวข้องในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น CAD และกลุ่มที่ไม่เป็น CAD ที่มารับการรักษาที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทั้งชายและหญิงที่มีอายุ $\geq$45 ปี

4. สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นภายในหลอดเลือดแดงเลี้ยงหัวใจ ซึ่งมักเป็นหลอดเลือดแดงที่มี artherosclerotic plaque ในปัจจุบันเชื่อว่าการทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมเป็นสาเหตุชักนำให้เกิด artherosclerosis ซึ่งการทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมจะทำให้ปล่อยสารที่มีคุณสมบัติเป็น thrombogenic ซึ่งได้แก่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการห้ามเลือดเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณหรือแอ็กติวิตี (activity) ของสารเหล่านั้นรวมทั้งโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่เกี่ยวข้องน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ในระยะแรกของการเกิด CAD ซึ่งจะมีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวางแผนการรักษาเพื่อป้องกันการเกิด acute coronary syndrome ในผู้ที่มีความเสี่ยง และเป็นการเฝ้าระวังไม่ให้เกิดอาการซ้ำในผู้ที่เคยมีอาการ ซึ่งนอกจากเป็นการลดอุบัติการณ์ของ CAD แล้วยังเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดความพิการในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ซึ่งนับว่าเป็นการสร้างเสริมและพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย CAD ในประเทศไทย

5. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

TM เป็น transmembrane glycoprotein ที่พบบนผิวของเซลล์เอนโดทีเลียมที่บุผนังของหลอดเลือดทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบบน syncytiotrophoblast ของรก และเซลล์อีกหลายชนิด เช่น mesothelial cell, osteoblast, dendritic cell เกล็ดเลือด โมโนซัยท์ และนิวโทรฟิล เป็นต้น จะถูกปล่อยออกจากผิวของเซลล์โดย proteolytic cleavage กลายเป็น soluble TM ซึ่งตรวจพบได้ในพลาสมาและปัสสาวะ โครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 557 ตัว ซึ่งประกอบด้วย 5 ส่วนที่สำคัญ คือ N-terminal domain หรือ lectin-like domain, epidermal growth factor (EGF)-like repeats, serine-threonine rich, transmembrane และ cytoplasmic tail[21,22] ซึ่งโครงสร้างแต่ละส่วนมีบทบาทที่แตกต่างกัน โดยส่วนที่เป็น EGF-like domain เป็นส่วนที่จับกับทรอมบินเพื่อที่จะเปลี่ยนโปรตีนซีให้อยู่ในรูปที่ถูกกระตุ้น (activated protein C; APC) APC ที่เกิดขึ้นจะยับยั้งแฟกเตอร์ V และ VIII ที่ถูกกระตุ้น ซึ่งเป็นการยับยั้งการสร้างลิ่มเลือด (anticoagulant) นั่นเอง นอกจากจะมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างลิ่มเลือดแล้ว APC ยังมีบทบาทลดการอักเสบโดยการกระตุ้น protease-activated receptor 1 (PAR-1)[23] สำหรับ TM เองก็มีบทบาทเกี่ยวกับการอักเสบเช่นกัน โดยมีทั้งผลโดยอ้อมและโดยตรง สำหรับผลโดยอ้อมนั้นเกิดจาก TM จับกับทรอมบินแล้ว ทำให้ทรอมบินไม่สามารถจับกับ PAR-1 ได้ ทำให้ลดบทบาทของทรอมบินในการทำให้เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์มารวมยังบริเวณที่มีการอักเสบ[24,25] นอกจากนี้ TM ที่จับอยู่กับทรอมบินจะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้น thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) โดยทรอมบิน ซึ่ง TAFI มีบทบาทในการสลาย pro-inflammatory mediator หลายชนิด เช่น bradykinin และคอมพลีเมนต์ (complement) C3a และ C5a ซึ่งมีผลทำให้ลดการอักเสบ[26] สำหรับผลโดยตรงของ TM เกี่ยวกับการอักเสบนั้น โครงสร้างของ TM ที่เกี่ยวข้องคือส่วนที่เป็น lectin-like domain โดยโครงสร้างส่วนนี้จะจับกับ high mobility group box 1 (HMGB1) protein ซึ่งหลั่งจากเซลล์ที่ตาย (necrotic cell) หรือโมโนซัยท์หลังจากกระตุ้นด้วย cytokines ทำให้ HMGB1 protein ไม่สามารถจับกับ receptor for advanced glycation end products (RAGE) บนผิวของเซลล์เอนโดทีเลียมทำให้ลดการอักเสบ[27] atherosclerosis เป็นการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งพบว่าในภาวะนี้ การจับกันระหว่าง TM กับ endothelial protein C receptor (EPCR) จะถูกยับยั้ง มีผลทำให้เกิดการอักเสบและ thrombosis ที่ผนังหลอดเลือดที่มี atherosclerosis ได้ง่ายขึ้น[28] นอกจากนี้ การตรวจพบ sTM ในพลาสมายังเป็นตัวบ่งชี้ของการทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียม โดยมีรายงานว่า sTM มีปริมาณสูงขึ้นในพลาสมาของผู้ป่วย CAD[8] และเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนจาก nephropathy และยังมีความสัมพันธ์กับระดับ homocysteine ในพลาสมาด้วย[29] สำหรับโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ TM นั้น Li และคณะ[30] ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึม G-33A กับ CAD ในชาวจีน พบว่าอัลลีล A33 มีความสัมพันธ์กับ CAD แต่ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับปริมาณของ sTM ในพลาสมาของผู้ป่วย CAD ยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นที่สนับสนุนว่าการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A เพิ่มความเสี่ยง

ต่อการเกิด CAD[31,32] แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าโพลีมอร์ฟิซึมนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด CAD[33]

จากที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นผลการวิจัยในชาวตะวันตกเป็นส่วนใหญ่ รายงานสำหรับชาวเอเชียมีในชาวจีน ญี่ปุ่นและอินเดีย ซึ่งผลที่ได้ไม่เหมือนกันทั้งหมด โดยเฉพาะในประเด็นของการเปลี่ยนแปลงของจีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีผลทำให้ความไวในการตอบสนองต่อปัจจัยเสี่ยงแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะทำการศึกษาในคนไทยซึ่งยังไม่มีรายงาน เพื่อจะได้ใช้เป็นข้อมูลสำหรับแพทย์ในการวางแผนการป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่เป็นคนไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะทำให้ลดอุบัติการณ์ของโรคและลดค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วยที่พิการเนื่องจากอาการรุนแรงของโรคได้

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

6.1 หน่วยงานทางด้านสาธารณสุขสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และสาธารณสุขมูลฐานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6.2 ให้บริการความรู้ให้ประชาชนทราบถึงความสัมพันธ์ของตัวบ่งชี้ของกระบวนการห้ามเลือดและจีนที่เกี่ยวข้องกับโรคหลอดเลือดหัวใจซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญ

6.3 เป็นพื้นฐานการวิจัยขั้นต่อไปซึ่งอาจนำไปสู่การติดตาม รักษา และป้องกันอาการรุนแรงของโรคหลอดเลือดหัวใจ

7. วิธีการดำเนินการวิจัย

7.1 กลุ่มศึกษา

อาสาสมัครสำหรับการวิจัยนี้ได้แก่ผู้ป่วยที่มีอาการเข้าข่าย CAD และเข้ารับการตรวจที่ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 327 ราย โดยเป็นเพศชาย 188 ราย และเพศหญิง 139 ราย ซึ่งอาสาสมัครเข้ารับการฉีดสีเพื่อดูการตีบของหลอดเลือดโคโรนารี (angiography) ในระหว่างเดือนสิงหาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2553 ซึ่งก่อนเริ่มโครงการวิจัย คณะผู้วิจัยได้รับอนุญาตในการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับผู้เข้าร่วมโครงการทุกรายจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับรูปแบบและวิธีการศึกษา และตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับข้อมูลเบื้องต้นและประวัติต่างๆในการดำเนินชีวิต ได้แก่ ประวัติการรับประทานยา การสูบบุหรี่ การดื่มเหล้า การรับประทานอาหาร และกิจกรรมการออกกำลังกาย เป็นต้น จากนั้นแพทย์ผู้ร่วมโครงการวิจัยจะทำการคัดกรองอาสาสมัครทั้งสองกลุ่ม ซึ่งอาสาสมัครทุกรายต้องมีคุณลักษณะเข้ากับเกณฑ์คัดเข้า (inclusion criteria) และเกณฑ์คัดออก (exclusion criteria) ที่กำหนดไว้ดังนี้

เกณฑ์คัดเข้า:

กลุ่มควบคุม

- เป็นอาสาสมัครเพศชายและเพศหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 45 ปีขึ้นไปที่เข้ารับการตรวจสุขภาพที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์และ/หรือโรงพยาบาลศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 138 ราย โดยเป็นเพศชาย 59 ราย และเพศหญิง 79 ราย

- ได้รับการตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ผู้ชำนาญการโรคหลอดเลือดหัวใจและยืนยันการวินิจฉัยด้วยผลการตรวจร่างกายและการตรวจพิเศษโดยทำ coronary angiography แล้วไม่พบหลอดเลือดหัวใจตีบอย่างชัดเจนตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรคหลอดเลือดหัวใจ

กลุ่มผู้ป่วย

- เป็นผู้ป่วยซึ่งมารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์และ/หรือโรงพยาบาลศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออก เฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทั้งเพศชายและเพศหญิง อายุตั้งแต่ 45 ปีขึ้นไป จำนวน 189 ราย โดยเป็นเพศชาย 129 ราย และเพศหญิง 60 ราย

- ได้รับการตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ผู้ชำนาญการโรคหลอดเลือดหัวใจและยืนยันการวินิจฉัยด้วยผลการตรวจร่างกายและการตรวจพิเศษโดยทำ coronary angiography แล้วยืนยันว่าเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรคหลอดเลือดหัวใจ (หรือได้รับการรักษาด้วยการทำ coronary revascularization มาก่อน) และผู้ป่วยต้องไม่มีอาการทางด้านหลอดเลือดหัวใจอย่างน้อยหนึ่งเดือนขึ้นไป เพื่อป้องกันผู้ป่วยที่ยังมีอาการ unstable angina

เกณฑ์คัดออก:

กลุ่มควบคุม

- กลุ่มควบคุมจะถูกคัดออกหากพบมีภาวะต่างๆเช่นเดียวกับ exclusion criteria ของกลุ่มผู้ป่วย

- วันที่ทำการตรวจวัดการทำงานของหลอดเลือด ต้องไม่มีไข้ ไม่ติดเชื้อ ไม่มีอาการอักเสบ และไม่รับประทานยาที่มีผลต่อหัวใจและหลอดเลือด

กลุ่มผู้ป่วย

- มีอาการเจ็บหน้าอก แบบ unstable angina

- ภาวะ left ventricular hypertrophy หรือภาวะหัวใจวาย (heart failure) หรือ valvular heart disease หรือ arrhythmia

- มีภาวะความดันเลือดสูงที่ไม่สามารถควบคุมได้

- มีภาวะ bleeding abnormalities

- ได้รับยา anticoagulant

- ป่วยเป็นโรค Deep vein thrombosis หรือ pulmonary embolism

- ป่วยเป็นโรคตับ

- ป่วยเป็นโรคไต

- ป่วยเป็นโรคมะเร็ง

- ป่วยเป็นโรคอักเสบอื่นๆ (inflammatory disease) ทั้งระยะเฉียบพลันและเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะอื่นๆ นอกเหนือจากหัวใจและหลอดเลือด

อาสาสมัครที่เข้าข่ายจะต้องให้คำยินยอมเข้ารับการศึกษาเป็นลายลักษณ์ตามใบยินยอมที่ผ่านการพิจารณาของคณะกรรม การจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE510414)

ในตอนเช้าก่อนการเจาะเลือดแพทย์จะทำการซักประวัติและตรวจร่างกายของอาสาสมัคร คณะผู้วิจัยวัดส่วนสูง เส้นรอบเอว เส้นรอบสะโพกและชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อทำการตรวจวัดระดับสารเคมีในเลือดรวมทั้งเตรียมดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) เพื่อศึกษาความชุกของโพลีมอร์ฟิซึมของจีนที่เกี่ยวข้อง

7.2 สิ่งส่งตรวจ

7.2.1 การเจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัคร จำนวน 12 ml โดยมีรายละเอียดดังนี้

7.2.1.1 เลือด 2 ml ใช้ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็ง ใช้สำหรับการตรวจ complete blood count (CBC) และสกัดดีเอ็นเอ จากเม็ดเลือดขาว

7.2.1.2 เลือด 3 ml ใช้ 3.2% trisodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็งในอัตราส่วนเลือด : สารกันเลือดแข็ง เท่ากับ 9:1 ปั่นแยกเตรียมเป็นพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อย (platelet poor plasma; PPP) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะทำการตรวจวัดระดับไฟบริโนเจนและ vWF ในพลาสมา

7.2.1.3 เลือด 1 ml ใช้โซเดียมฟลูออไรด์เป็นสารกันเลือดแข็ง แล้วปั่นแยกพลาสมาสำหรับตรวจระดับน้ำตาลในเลือด (fasting blood sugar; FBS)

7.2.1.4 เลือด 6 ml ไม่ใช้สารกันเลือดแข็ง ปั่นแยกซีรัมสำหรับตรวจวัดระดับ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, การทดสอบหน้าที่ของตับ [total protein, albumin, globulin, aspatate transferase (AST), alanine transferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP)] ระดับไขมันในเลือด [total cholesterol (TC), trigleceride (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C)] และ high sensitive-C-reactive protein (hs-CRP)

7.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ

เตรียมดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวจากเลือดที่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป FlexiGene (QIAGEN; Germany) แล้ววัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (NanoVue spectrophotometer; GE healthcare, U K) ที่ความยาวคลื่น 260, 280 และ 320 nm จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของของดีเอ็น

เอแล้วปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 100 μg/ml โดยการเติม Tris EDTA (TE) buffer แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะทำการศึกษา

สำหรับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm และค่า OD ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-1.9

7.3 วิธีการศึกษา

7.3.1 การตรวจวัดระดับสารเคมีในเลือดของอาสาสมัคร

ตรวจวัดระดับสารเคมีในเลือดของอาสาสมัครทำการตรวจวัดที่ห้องปฏิบัติของศูนย์หัวใจสิริกิติ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้แก่ FBS, BUN, creatinine, การทดสอบหน้าที่ของตับ ระดับไขมันในเลือด และ CBC โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปและตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ CX4 Beckman automatic analyzer (Beckman Instruments, Inc., USA) สำหรับ LDL-C คำนวณจากสูตร Friedewald [LDL-C = TC - HDL-C - (TG/5)] สำหรับ hs-CRP ตรวจวัดด้วยวิธี immunonephelometry โดยใช้น้ำยา *Cardio*Phase* hsCRP ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ BN Prospec® system

7.3.2 การตรวจวัดระดับ TM ในพลาสมา

ตรวจวัดระดับของ TM ในพลาสมาด้วยวิธี in-house sandwich ELISA โดยใช้น้ำยา human Thrombomodulin DuoSet ELISA ของ R&D Systems, Inc., USA ซึ่งประกอบด้วย 1) capture antibody คือ mouse anti-human TM ซึ่งจำเพาะต่อกรดอะมิโนลำดับที่ 19-515 (Ala19-Ser515) ของ TM เมื่อละลายด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จะมีความเข้มข้น 360 μg/ml 2) detection antibody คือ mouse anti-human TM ที่ conjugate กับ biotin เมื่อละลายด้วย PBS ที่มี 1%BSA (reagent diluent) จะมีความเข้มข้น 160 μg/ml 3) standard คือ recombinant human TM เมื่อละลายด้วย reagent diluent จะมีความเข้มข้น 60 ng/ml และ 4) streptavidin-HRP คือ เอนไซม์ horseradish-peroxidase ที่ conjugate กับ streptavidin โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

7.3.2.1 เคลือบไมโครเพลต (microplate; Nunc-Immuno Maxisorp, Roskilde, Denmark) ด้วย capture antibody ที่มีความเข้มข้น 2 μg/ml ปิดเพลตด้วยแผ่นพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหย แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง

7.3.2.2 ล้างแต่ละหลุมของไมโครเพลตด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween (wash buffer) 3 ครั้ง จากนั้นยับยั้งปฏิกิริยาไม่จำเพาะด้วย reagent diluent แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

7.3.2.3 เมื่อครบเวลา ล้างไมโครเพลตด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วเติมพลาสมาที่เจือจาง 1:10 ด้วย reagent diluents หรือเติม standard ที่มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 20 to 0.312 ng/ml จำนวน 7 ความเข้มข้น 100 μl ลงในแต่ละหลุม แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.3.2.4 เมื่อครบเวลา ล้างไมโครเพลตด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วเติม detection antibody แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

7.3.2.5 เมื่อครบเวลา ล้างไมโครเพลตด้วย wash buffer แล้วเติม streptavidin-HRP 100 μl แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาทีพอดี

7.3.2.6 เมื่อครบเวลา ล้างไมโครเพลตด้วย wash buffer แล้วเติมซับสเตรท ซึ่งได้แก่ ส่วนผสมระหว่าง H_2O_2 และ tetramethylbenzidine (TMB) หลุมละ 100 μl เป็นเวลา 20 นาทีพอดี

7.3.2.7 เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 2N H_2SO_4 50 μl

7.3.2.8 วัด OD ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (Tecan, Sunrise, Austria) ที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยมีความยาวคลื่น 570 nm เป็น reference wavelength

7.3.2.9 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและ OD ของ standard ที่วัดได้โดยใช้สเกล log ทั้งแกน X และ Y แล้วเทียบค่า OD ของพลาสมาเป็นความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน

การตรวจวัดปริมาณ TM ด้วยวิธีนี้ มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) แบบ within run เท่ากับ 4.0% และแบบ between run เท่ากับ 8.7% นการตรวจวัดแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 2 ค่า และทดสอบพลาสมาควบคุมด้วยทุกครั้ง หากค่าที่ได้จากพลาสมาควบคุมไม่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 2.1-2.9 ng/ml (mean±2SD ของพลาสมาควบคุม) จะต้องทำการตรวจวัดตัวอย่างซ้ำก่อนที่จะนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผล

7.3.3 การตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A โดยวิธี polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Zhao และคณะ[33] ซึ่งมีลำดับของนิวคลิโอไทด์ตามรายละเอียดต่อไปนี้

Forward 5'-GGC CAG GGC TCG AGT TTA TAA AGG C-3'

Reverse 5'-CGG GGA CAG TCG TCT GTT ACA G-3'

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1 μM ของ forward และ reverse primers 0.2 mM dNTPs, 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, Taq DNA polymerase 0.6 units และดีเอ็นเอ 100 ng สำหรับโปรแกรมการทำ PCR ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำ PCR จำนวน 32 รอบ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที annealing ที่ 60°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72°C เป็นเวลา 40 วินาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 8 นาที

PCR product ที่ได้มีขนาด 260 bp ซึ่งตรวจสอบด้วยการทำ agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose gel เป็น 2% ดังแสดงในรูปที่ 1

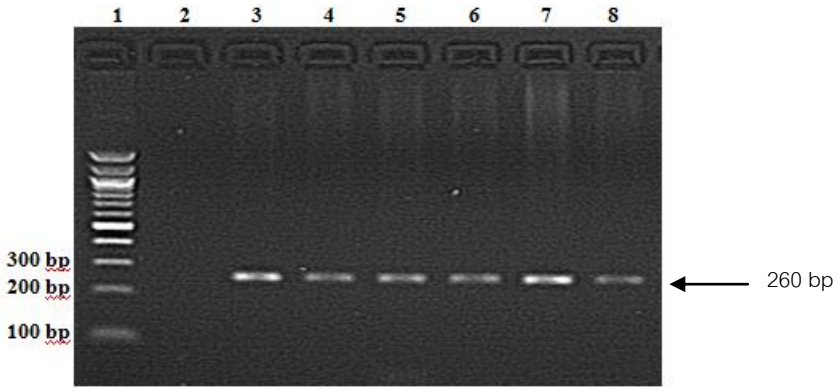

Fig. 1: Amplified PCR products on 2% agarose gel for detection the TM G33A polymorphism. The size of the products is 260 bp. (lane 1: 100 bp ladder, lane 2: no template control and lane 3-8: DNA samples)

หลังจากที่ได้ PCR product แล้ว ย่อย PCR product ที่ได้ด้วยเอนไซม์ *Stu*I ซึ่งมีลำดับนิวคลิโอไทด์ 5'... A GG*CC T...3' เป็น recognition site ที่ความเข้มข้น 2 units โดทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบผลที่ได้จากการย่อยโดยการทำ agarose gel electrophoresis ทีมีความเข้มข้นของ agarose gel เป็น 3% หากมีโพลีมอร์ฟิซึมเกิดขึ้น จะทำให้เกิด recognition site ของเอนไซม์ ทำให้เกิดเป็น product 2 ขนาดคือ 233 และ 27 bp ในกรณีที่ไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม จะไม่มีการย่อยโดยเอนไซม์ จึงยังคงได้ product ที่มีขนาด 260 bp ทำให้สามารถแยกจีโนไทป์ของโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A ได้ดังนี้คือ จีโนไทป์ GG = 260 bp GA= 260, 233, 27 bp (ขนาด 27 bp ไม่สามารถมองเห็นได้) และ AA= 233, 27 bp (ขนาด 27 bp ไม่สามารถมองเห็นได้) ดังแสดงในรูปที่ 2

สำหรับการควบคุมคุณภาพการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมโดยวิธี PCR-RFLP เพื่อเป็นการยืนยันว่าดีเอ็นเอที่เป็นอัลลีล G ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น ไม่ได้เกิดจากการไม่ทำงานของเอนไซม์ ได้ใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์ว่าเป็น GG และ GA ในการทำ PCR-RFLP ในแต่ละครั้ง

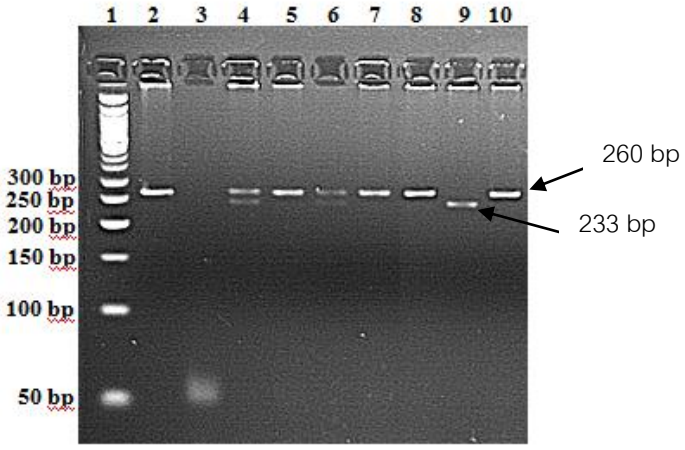

Fig. 2: Agarose gel shows digested PCR products by 2 units of *Stu*I restriction enzyme for detection of the TM G33A polymorphism. (lane 1: 50 bp ladder, lane 2: uncut, lane 3: no template control, lane 4 and 6ซ GA, lane 5, 7, 8 and 10: GG and lane 9: AA)

7.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทดสอบข้อมูลที่มีค่าแบบต่อเนื่อง (continuous value) ว่ามีการกระจายของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ (normal distribution) หรือไม่โดยสถิติ Kolmogorov-Smirnov หากข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่เป็นโค้งปกติ เปลี่ยนข้อมูลให้อยู่ในรูปของ log10 ก่อน แล้วจึงใช้สถิติแบบใช้พารามิเตอร์ (parametric test) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวแปรระหว่าง 2 กลุ่มโดยสถิติ Student's t-test หากมากกว่า 2 กลุ่ม เปรียบเทียบโดยสถิติ ANOVA สำหรับข้อมูลที่เป็นสัดส่วนหรือความถี่เปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Chi-square นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่เป็นข้อมูลต่อเนื่องโดยใช้สถิติ Person correlation ซึ่งความแตกต่างหรือความสัมพันธ์มีระดับนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p-value < 0.05

ผลการศึกษา

1. ลักษณะทั่วไปทางคลินิกและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มตัวอย่าง

ผลการวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ป่วย CAD จำนวน 189 ราย และกลุ่มควบคุม 138 ราย ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีอายุใกล้เคียงกัน แต่สัดส่วนเพศชาย สัดส่วนของผู้ที่สูบบุหรี่ มีไขมันในเลือดผิดปกติ เป็นเบาหวาน และมีความดันโลหิตสูง ในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ระดับน้ำตาลในเลือด ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (systolic blood pressure; SBP) ไตรกลีเซอร์ไรด์ (triglyceride; TG) คอเลสเทอรอลรวม (total cholesterol; TC) และ low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) ในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ HDL-C ในกลุ่มผู้ป่วยต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

2. ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A ในกลุ่มตัวอย่าง

ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

3. ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A กับปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ

เมื่อวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์ GG, GA และ AA ในอาสาสมัครที่มีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ดังกล่าวในอาสาสมัครที่มีไขมันในเลือดสูงผิดปกติ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วน และสูบบุหรี่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

4. ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึม TM G33A กับจำนวนหลอดเลือดที่ตีบ

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนหลอดเลือดที่ตีบและโพลีมอร์ฟิซึม TM G433A พบว่าความถี่จีโนไทป์ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนหลอดเลือดที่ตีบ (ตารางที่ 4)

6. ระดับของ TM ในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างและความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ

ระดับของ TM ในพลาสมาของผู้ป่วย CAD และกลุ่มควบคุม มีค่า mean$\pm$SD เท่ากับ 3.2 $\pm$ 1.3 และ 3.0±1.4 ng/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.328) (ตารางที่ 1) เมื่อวิเคราะห์แยกตามจีโนไทป์ พบว่าระดับของ TM ในแต่ละจีโนไทป์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) แต่เมื่อวิเคราะห์ระดับของ TM โดยแยกตามปัจจัยเสี่ยง พบว่ากลุ่มผู้ที่เป็นเบาหวานมีระดับของ TM ในพลาสมาสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือด ในขณะที่มีความสัมพันธ์กับอายุ ความดันโลหิตขณะที่หัวใจบีบตัว ไตรกลีเซอร์ไรด์ และ HDL-C (ตารางที่ 7)

Table 1: Demographic data and biochemical variables in subjects with CAD and without CAD (non-CAD)

Variables	CAD (n=189)	Non-CAD (n=138)	*p*-value
Age (years)	61.9 ± 8.8	60.4 ± 9.1	0.150
Male, n (%)	129 (68.3)	59 (42.8)	<0.001
Smoking, n (%)	72 (38.1)	30 (21.7)	0.002
Obesity, n (%)	89 (47.3)	58 (42.0)	0.341
Dyslipidemia, n (%)	181 (95.8)	118 (85.5)	0.001
Diabetic mellitus, n (%)	70 (37.2)	32 (22.5)	0.009
Hypertension, n (%)	158 (83.6)	95 (68.8)	0.002
BMI (kg/m^2)	25.0 ± 3.3	24.9 ± 3.6	0.696
FBS (mg/dL)	110.5 ± 54.2	101.2 ± 39.3	0.012
SBP (mmHg)	131.4 ± 17.8	126.8 ± 18.9	0.030
DBP (mmHg)	73.9 ± 11.7	72.9 ± 9.6	0.392
TG (mg/dL)	169.6 ± 116.4	136.4 ± 77.6	<0.001
TC (mg/dL)	181.1 ± 50.1	170.1 ± 42.6	0.041
HDL-C (mg/dL)	37.8 ± 10.0	45.4 ± 20.1	<0.001
LDL-C (mg/dL)	103.9 ± 40.3	89.9 ± 36.3	0.001
TM (ng/ml)	3.2 ± 1.3	3.0±1.4	0.328

Value are expressed as mean±SD

Table 2: TM G33A polymorphism in patients with CAD compared to non-CAD group

Genotype, n (%)	CAD (n=189)	Non-CAD (n=138)	*p*-value
GG (n=287)	164 (92.1)	123 (92.5)	0.910
GA+AA (n=24)	14 (7.9)	10 (7.5)	
Allele frequencies, n (%)			
G allele	342 (96.1)	254 (95.5)	0.721
A allele	14 (3.9)	12 (4.5)	

Table 3: Association of TM G33A polymorphism with traditional risk factors for CAD

Traditional risk factors	Genotype frequencies		p-value
	GG	GA+AA	
Dyslipidemia (n=321)			
Normolipidemia (n=27); n (%)	25 (92.6)	2 (7.4)	0.890
Dyslipidemia (n=294); n (%)	270 (91.8)	24 (8.2)	
DM (n=318)			
Non-DM (n=218); n (%)	201 (92.2)	17 (7.8)	0.950
DM (n=100); n (%)	92 (92.0)	8 (8.0)	
Hypertension (n=321)			
Non-hypertension (n=73); n (%)	67 (91.8)	6 (8.2)	0.966
Hypertension (n=248); n (%)	228 (91.9)	20 (8.1)	
Obesity (n)			
Non-obesity (n=183); n (%)	171 (93.4)	12 (6.6)	0.243
Obesity (n=138); n (%)	127 (89.9)	124 (10.9)	
Smoking (n=322)			
Non-smoking (n=221); n (%)	201 (91.0)	20 (9.0)	0.342
Smoking (n=101); n (%)	95 (94.1)	6 (5.9)	

Table 4: The association of TM G33A polymorphism with the number of coronary vessel disease in subjects who undergoing coronary angiogram

Genotypes	Number of diseased vessels					p-value
n (%)	0 (n=132)	1 (n=49)	2 (64)	3 (53)	4 (13)	
GG	122 (92.4)	46 (93.9)	61 (95.3)	46 (86.8)	12 (92.3)	0.517
GA+AA	10 (7.5)	3 (6.1)	3 (4.7)	7 (13.2)	1 (7.7)	

Table 5: Plasma TM levels in subjects possessed each genotype of the TM G-33A polymorphism

Subjects/genotypes	TM levels (ng/ml)	p-value
All (n=142)		
GG (n=129)	3.1±1.3	0.685
GA+AA (n=13)	3.3±1.6	
CAD (n=72)		
GG (n=67)	3.2±1.3	0.265
GA+AA (n=5)	2.7±0.7	
Non-CAD (n=60)		
GG (n=54)	2.9±1.4	0.219
GA+AA (n=6)	3.7±1.8	

Table 6: Plasma TM levels in subjects with each traditional risk factors for CAD

Risk factors	TM levels (ng/ml)	p-value
Dyslipidemia (n=153)		
Normolipidemia (n=17)	2.9± 0.7	0.135
Dyslipidemia (n=136)	3.2 ± 1.4	
Diabetic mellitus (n=150)		
Non-DM (n=96)	2.9 ± 1.1	0.004
DM (n=96)	3.5 ± 1.7	
Hypertension (n=153)		
Non-HT (n=39)	2.8 ± 1.1	0.076
HT (n=114)	3.2 ± 1.5	
Obesity (n=154)		
Non-obesity (n=90)	3.2 ± 1.4	0.526
Obesity (n=64)	3.0 ± 1.4	
Smoking (n=154)		
Non-smoker (n=104)	3.0 ± 1.4	0.112
Smoker (n=50)	3.3 ± 1.4	

Table 7: Correlations between TM levels and risk factors for CAD

Risk factors	Correlation coefficient (r)	p-value
Age (years)	0.295	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	0.244	0.002
Waist/hip ratio	0.234	0.016
Total cholesterol (mg/dL)	-0.106	0.204
Triglycerides (mg/dL)	0.179	0.031
LDL-C (mg/dL)	-0.096	0.205
HDL-C (mg/dL)	-0.012	0.010
Fasting blood sugar (mg/dL)	0.151	0.079

วิจารณ์ผลการศึกษา

โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) เป็นโรคที่พบมากในขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศไทย และเป็นสาเหตุที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตมากเป็นอันดับสองรองจากการประสบอุบัติเหตุ โดยมีปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ ได้แก่ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) การสูบบุหรี่ และการขาดการออกกำลังกาย เป็นต้น ในการวิจัยนี้พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่พบในผู้ป่วย CAD เป็นสัดส่วนมากเรียงตามลำดับดังนี้คือ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ความดันโลหิตสูง อ้วน การสูบบุหรี่ และเบาหวาน โดยพบภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ มากถึง 95.8% ในขณะที่พบการเป็นเบาหวาน 37.2 % และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้ระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีหลอดเลือดหัวใจหลักที่ตีบเกิน 50% พบว่าสัดส่วนของภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ความดันโลหิตสูง การสูบบุหรี่ และการเป็นเบาหวานในผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าไขมันในเลือดผิดปกติเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิด CAD และพบภาวะความดันโลหิตสูงได้มากถึง 75% ของผู้ป่วย CAD[34-36] สำหรับภาวะไขมันในเลือดผิดปกติที่พบในงานวิจัยนี้พบว่ามีระดับ TG, TC และ LDL-C สูงขึ้น ในขณะที่ระดับของ HDL-C ลดต่ำลง เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า atherogenic dyslipidemia ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการทำนายการเกิดความเสี่ยงต่อการเกิดความผิดปกติของระบบหลอดเลือดและหัวใจในผู้ป่วย CAD[37]

Atherosclerosis เป็นสาเหตุชักนำสำคัญในการทำให้เกิด CAD ในปัจจุบันเชื่อว่าการอักเสบเป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำให้เกิด atherosclerosis ที่ผนังของหลอดเลือด ซึ่งมีผลทำให้เซลล์เอนโดทีเลียมที่บุผนังหลอดเลือดมีความผิดปกติและเกิดขึ้นเป็นเวลานานแล้วทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมผิดปกติ ดังนั้นความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมจึงเป็นตัวบ่งชี้ระยะแรกของการเกิด CAD ตัวบ่งชี้หนึ่งของการทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมคือ TM ซึ่งมีรายงานว่าการมีระดับสูงขึ้นในพลาสมามีความสัมพันธ์กับการเกิด atherosclerosis[38] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมบน promoter ของจีน TM โดยมีการเปลี่ยนของนิวคลีโอไทด์ชนิด guanine (G) ไปเป็น adenine (A) ที่ตำแหน่ง -33 มีความสัมพันธ์กับระดับของ TM ในพลาสมา งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณของ TM ในพลาสมา และศึกษาความสัมพันธ์กับโพลีมอร์ฟิซึมดังกล่าว รวมทั้งความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ต่อการเกิด CAD พบว่า ระดับของ TM ในกลุ่มผู้ป่วย CAD สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ปัจจัยหนึ่งที่อาจทำให้ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Tohda และคณะ[38] อาจเนื่องมาจากผู้ป่วย CAD ส่วนใหญ่ได้รับยา statin (91.9% ของผู้ป่วย CAD และ 71.7% ของกลุ่มควบคุม) ซึ่งเป็นยาลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือด และมีผลกดการแสดงออกของจีนของเซลล์เอนโดทีเลียม ส่งผลให้มีระดับของ TM ลดลง[39] ดังนั้น

จึงทำให้ไม่พบความแตกต่างของ TM ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าแม้ว่าระดับของ TM ในพลาสมาของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่มตัวอย่างที่มีภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวานมีระดับ TM สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติ มีผลทำให้เซลล์เอนโดทีเลียมทำหน้าที่ผิดปกติ และปล่อย TM เข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น ซึ่งระดับ TM ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาของการเป็นเบาหวาน[40] แต่ผลการวิจัยครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือดกับระดับของ TM ทั้งนี้อาจเนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานได้รับยาที่ลดระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งเป็นการควบคุมระดับน้ำตาลไม่ให้สูงเกินไป จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในงานวิจัยนี้

เมื่อตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม TM G-33A ในกลุ่มตัวอย่าง พบว่าความถี่จีโนไทป์ GA+GG ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย CAD และกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (7.9 และ 7.5% ตามลำดับ) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาอื่นในชาวเอเชียพบว่าผลที่พบในงานวิจัยนี้มีความถี่ค่อนข้างต่ำกว่าเชื้อชาติอื่น โดยความถี่ที่พบในกลุ่มควบคุมชาวเกาหลี จีนไต้หวัน และจีนฮั่น ญี่ปุ่น เท่ากับ 15.7, 16.22 และ 18.6%[30,31,33] นอกจากนี้การศึกษาของ Park และคณะ[31] และ Li และคณะ[30] ยังพบว่าโพลีมอร์ฟิซึมนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิด MI ในขณะที่ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิด CAD ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความรุนแรงของอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยมีความแตกต่างกัน กล่าวคือในการศึกษานี้ผู้ป่วยมีเพียงอาการ stable angina pectoris ซึ่งยังไม่มีการแตกของ atherosclerotic plaque ในขณะที่ MI จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีการแตกของ plaque และมี thrombosis ตามมา นอกจากนี้เกณฑ์ในการแยกระหว่างผู้ป่วย CAD ก็มีความแตกต่างกัน โดย Li และคณะ ใช้เกณฑ์การตีบของ coronary artery 70% ส่วนงานวิจัยนี้ใช้เกณฑ์การตีบที่ 50% ซึ่งเป็นเกณฑ์ดียวกับการศึกษาของ Zhao และคณะ[33] ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึมนี้กับ CAD เช่นกัน

การพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TM ในพลาสมากับการเป็นเบาหวานในกลุ่มตัวอย่างที่มี atherosclerosis รวมทั้งความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ต่อการเกิด CAD ได้แก่ อายุ ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว ไตรกลีเซอร์ไรด์ และ HDL-C แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดระดับ TM ในพลาสมาอาจมีประโยชน์ในการพยากรณ์ภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่จะเกิดขึ้นในผู้ที่มีภาวะ atherosclerosis ได้ ซึ่งหากมีการรักษาในเชิงป้องกันภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เหล่านี้ น่าจะเป็นการทำให้ผู้ที่เสี่ยงมีอายุที่ยืนนานขึ้นและมีคุณภาพชีวิตของตนเองและบุคคลในครอบครัวที่ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ TM ในพลาสมาและปัจจัยดังกล่าว เช่น การอักเสบ มีบทบาทในการทำให้เกิด CAD ดังนั้นเพื่อให้การพยกรณ์ความผิดปติดังกล่าวมีความแม่นยำยิ่งขึ้น จึงควรที่มีการตรวจวัดบ่งชี้อื่น ๆ เช่น cytokines ร่วมกับการตรวจวัดระดับ TM ด้วย

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน ได้แก่ กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด CAD เช่นเดียวกับกลุ่มผู้ป่วย ซึ่งอาจมีผลทำให้ไม่พบความแตกต่างของ TM ที่ตรวจวัด รวมทั้งกลุ่มตัวอย่างจำนวนมากที่ได้รับยาที่มีผลต่อระดับของ TM แต่ปัจจัยทั้งสองเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ เนื่องผู้ที่มีความเสี่ยงจะต้องได้รับการรักษา รวมทั้งการรวบรวมอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงเพื่อทำ coronary angiography เป็นสิ่งที่ทำได้ยากมาก หากเป็นไปได้ ควรจะวิเคราะห์ข้อมูลในกลุ่มที่ไม่ได้รับยาแล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มที่ได้รับยา แต่สำหรับกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยนี้ มีสัดส่วนของผู้ที่ไม่ได้รับยาน้อยจึงไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าว นอกจากนี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ของการเกิด CAD ซึ่งอาจจะทำให้พบความแตกต่างที่ชัดเจนขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Carey WD, Dumot JA, Pimentel RR, Barnes DS, Hobbs RE, Henderson JM, Vogt DP, Mayes JT, Westveer MK, Easley KA. The prevalence of coronary artery disease in liver transplant candidates over age 50. *Transplantation*. 1995;59:859-864
2. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*. 1997;336:1276-1282
3. Hennekens CH. Increasing burden of cardiovascular disease: Current knowledge and future directions for research on risk factors. *Circulation*. 1998;97:1095-1102
4. Davignon J. Advances in drug treatment of dyslipidemia: Focus on atorvastatin. *Can J Cardiol*. 1998;14 Suppl B:28B-38B
5. Blann AD, Lanza F, Galajda P, Gurney D, Moog S, Cazenave JP, Lip GY. Increased platelet glycoprotein v levels in patients with coronary and peripheral atherosclerosis--the influence of aspirin and cigarette smoking. *Thromb Haemost*. 2001;86:777-783
6. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-420
7. Piro M, Giubilato G, Pinnelli M, Giordano Sciacca P, Biasucci LM. Endothelium and inflammation. *Panminerva Med*. 2005;47:75-80
8. Ruef J, Marz W, Winkelmann BR. Markers for endothelial dysfunction, but not markers for oxidative stress correlate with classical risk factors and the severity of coronary artery disease. *Scand Cardiovasc J*. 2006;40:274-279
9. Lee KW, Blann AD, Lip GY. Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction [circulating endothelial cells, von willebrand factor and flow-mediated dilatation] to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2006;111:302-308
10. Wu GF, Du ZM, Hu CH, Zheng ZS, Zhan CY, Ma H, Fang DQ, Hui JC, Lawson WE. Microvessel angiogenesis: A possible cardioprotective mechanism of external counterpulsation for canine myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118:1182-1189
11. Skoumas I, Masoura C, Pitsavos C, Tousoulis D, Papadimitriou L, Aznaouridis K, Chrysohoou C, Giotsas N, Toutouza M, Tentolouris C, Antoniades C, Stefanadis C.

Evidence that non-lipid cardiovascular risk factors are associated with high prevalence of coronary artery disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia or familial combined hyperlipidemia. *Int J Cardiol*. 2007;121:178-183

12. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating cd31+/annexin v+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:112-116
13. Kostner KM, Fahti RB, Case C, Hobson P, Tate J, Marwick TH. Inflammation, complement activation and endothelial function in stable and unstable coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2006;365:129-134
14. Pitsavos C, Choumerianou DM, Skoumas J, Maumus S, Stefanadis C, Dedoussis GV, Visvikis-Siest S. Apolipoprotein e polymorphism is not associated with lipid levels and coronary artery disease in greek patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Exp Med*. 2005;5:196-201
15. Yongbin N, Dayi H, Hong Y, Cuilan L, Wenling L, Hongyu W, Lei L. Association of genetic polymorphisms in the fibrinogen and platelet glycoprotein genes with unstable angina in chinese patients. *Clin Cardiol*. 2004;27:455-458
16. Warnholtz A, Wild P, Ostad MA, Elsner V, Stieber F, Schinzel R, Walter U, Peetz D, Lackner K, Blankenberg S, Munzel T. Effects of oral niacin on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: Results of the randomized, double-blind, placebo-controlled inef study. *Atherosclerosis*. 2009;204:216-221
17. Tjarnlund A, Andersson M, Jood K, Ladenvall P, Jern C. Rapid genotyping of haemostatic gene polymorphisms using the 5' nuclease assay. *Thromb Haemost*. 2003;89:936-942
18. Khuseyinova N, Imhof A, Rothenbacher D, Trischler G, Kuelb S, Scharnagl H, Maerz W, Brenner H, Koenig W. Association between lp-pla2 and coronary artery disease: Focus on its relationship with lipoproteins and markers of inflammation and hemostasis. *Atherosclerosis*. 2005;182:181-188
19. Bottiger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schomig K, von Beckerath N, Schomig A. Hpa-1 and hpa-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2000;83:559-562

20. van der Meer IM, Brouwers GJ, Bulk S, Leebeek FW, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC, Gomez Garcia EB. Genetic variability of von willebrand factor and risk of coronary heart disease: The rotterdam study. *Br J Haematol*. 2004;124:343-347

21. Conway EM. Thrombomodulin and its role in inflammation. Semin Immunopathol 2012; 34:107–25

22. Li YH, Kuo CH, Guey-Yueh Shi GY, Wu HL. The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation. J Biomd Sci 2012, 19:34.

23. Feistritzer C, Riewald M: Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. Blood 2005, 105:3178-3184.

24. Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. Am J Pathol 1994; 144: 975-85.

25. Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106) Blood 1998; 92: 1259-67.

26. Leung LL, Myles T, Nishimura T, Song JJ, Robinson WH. Regulation of tissue inflammation by thrombin-activatable carboxypeptidase B (or TAFI). Mol Immunol 2008; 45: 4080-3.

27. Ito T, Kawahara K, Okamoto K, Yamada S, Yasuda M, Imaizumi H, et al. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 1825-30.

28. Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. -regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. Am J Pathol 2001; 159: 797–802.

29. Seino Y, Takita T, Tanaka K, Takano T, Hayakawa H, Okumura H. Clinical features and coronary backgrounds of coexistent peripheral vascular disease in japanese coronary artery disease patients. *Angiology*. 1991;42:899-907.

30. Li YH, Chen JH, Wu HL, Shi GY, Huang HC, Chao TH, et al. G-33A Mutation in the promoter Region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. Am J Cardiol 2000; 85:8–12.
31. Park HY, Nabika T, Jang Y, Kwon HM, Cho SY, Masuda J. Association of G-33A polymorphism in the thrombomodulin gene with myocardial infarction in Koreans. Hypertens Res 2002; 25: 389-94.
32. Tazawa R, Hirosawa S, Suzuki K, Hirokawa K, Aoki N. Functional characterization of the 5'-regulatory region of the human thrombomodulin gene. J Biochem 1993; 113(5): 600-6.
33. Zhao J, Zhou X, Huang J, Chen J, Gu D. Association study of the thrombomodulin -33G>A polymorphism with coronary artery disease and myocardial infarction in Chinese Han population. Int J Cardiol 2005; 100: 383-8.
34. Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentrations and smoking. A preliminary report from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. JAMA 1990; 264: 3018 –24.
35. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. N Engl J Med 1998: 338:1650–6.
36. Vongpatanasin W. Management of hypertension in patients with coronary artery disease. Curr Hypertens Rep 2008;10: 349-54.
37. Arca M, Montali A, Valiante S, Campagna F, Pigna G, Paoletti V, Antonini R, Barilla F, Tanzilli G, Vestri A, Gaudio C. Usefulness of atherogenic dyslipidemia for predicting cardiovascular risk in patients with angiographically defined coronary artery disease. Am J Cardiol 2007; 100: 1511-6.
38. Tohda G, Oida K, Okada Y, et al. Expression of thrombomodulin in atherosclerosis lesions and mitogenic activity of recombinant thrombomodulin in vascular smooth muscle cells. Arterioacler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1861-9.
39. Bergh N, Larsson P, Ulfhammer E, Jern S. Effect of shear stress, statins and TNF-α on hemostatic genes in human endotheliul cells. Biochem Biophysic Res Com 2012; 420: 166-71.

40. Califano F, Giovanniello T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, et al. Clinical importance of thrombomodulin serum levels. Eur Rev Med Pharmacol Aci 2000; 4: 59-66.

ภาคผนวก

คณะผู้วิจัย

ระดับของปัจจัยการห้ามเลือดที่สัมพันธ์กับการทำงานผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมและจีนที่เกี่ยวข้องในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ นันทรัตน์ โฆมานะสิน และคณะ โครงการชุด : ระดับของตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีในเลือดและปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลต่อความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2554

ภาคผนวก คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรัตน์ โฆมานะสิน กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ร่วมโครงการ

1. ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยทัศน์ ทัศนาวิวัฒน์ ภาควิชาอายุรศาตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. นายแพทย์ พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เศรษฐเสถียร กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. รองศาสตราจารย์ ดร. ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาตรี เศรษฐเสถียร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. ผู้ช่วยศาตราจารย์ ไพศาล มงคลวงศ์โรจน์ กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น