

การศึกษาความสัมพันธ์ของ *MTHFR* (C677T) และ *ADIPOQ* (G276T)

ยีนโพลีมอร์ฟิซึมกับระดับไขมันในเลือดในผู้สูงอายุ

The Association of *MTHFR* (C677T) and *ADIPOQ* (G276T)

Gene Polymorphisms with Blood Lipid Levels in the Elderly

ศักดิ์ดา กันยาเลิศ (Sakda Kanyalert)* ดร.ชาตรี เสรฐฐาเสถียร (Dr.Chatri Settatsatian)^{1**}

ดร.นงนุช เสรฐฐาเสถียร (Dr.Nongnuch Settatsatian)*** อิงครัตน์ ศรีติไพบูลย์ (Ingkarat Sarutipai boon) ****

รุจิกรณ รัตนธรรม (Rujikorn Rattanatham)**** นิสา เดชาราชกุล (Nisa Decharatchakul)****

(Received: May 10, 2019; Revised: October 1, 2019; Accepted: October 7, 2019)

บทคัดย่อ

ภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับโฮโมซิสเตอีน และระดับอะดิโปเนคตินในเลือด ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือด วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* C677T (rs1801133) และ *ADIPOQ* G276T (rs1501299) กับระดับไขมันในเลือด ในประชากรไทยอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไป จำนวน 648 คน ที่เข้ารับการตรวจสุขภาพประจำปีจากศูนย์สุขภาพที่ 15 กรุงเทพมหานคร ทำการตรวจจีโนมด้วยวิธี PCR-RFLP และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ สำหรับ *MTHFR* C677T พบว่าการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ LDL-C สัมพันธ์กับจำนวนของอัลลีล T ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-trend = 0.042) และอัลลีล T ของ *MTHFR* (C677T) สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ LDL-C สูงกว่าปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR(95%CI) = 1.435 (1.073-1.920), p=0.015] และสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR (95%CI) = 1.434 (1.039-1.978), p=0.033] สำหรับ *ADIPOQ* G276T พบว่าระดับ HDL-C มีแนวโน้มลดลงสัมพันธ์กับการมีจำนวนของอัลลีล T ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-trend=0.042) เมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มประชากรทั้งหมด และพบว่าอัลลีล T สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ [OR(95%CI) = 1.351 (1.025-1.781), p=0.033] ผลกระทบร่วมระหว่างพาหะอัลลีล T ของทั้งสองโพลีมอร์ฟิซึม (CT+TT/GT+TT) สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR(95%CI)=2.037 (1.215-3.417) p=0.007] โดยสรุปผลจากการศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน *MTHFR* และ *ADIPOQ* มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือด ซึ่งอาจสนับสนุนการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด

¹Corresponding author: schatr@kku.ac.th

*นักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

****นักศึกษาระดับปริญญาโท ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ABSTRACT

The abnormal level of blood lipids is the major risk factor for cardiovascular disease. Genetic variations have been associated with altered homocysteine and adiponectin levels that involving blood lipid alteration. The aimed of this study was, therefore, to investigate the association of *MTHFR* C677T (rs1801133) and *ADIPOQ* G276T (rs1501299) polymorphisms with blood lipid levels. The study was conducted in community-based 648 Thai subjects aged ≥ 50 years who attended for annual health check-up at Health Center 15, Bangkok. The genotyping was performed using PCR-RFLP. Regarding *MTHFR* C677T, increasing level of plasma LDL-C was observed in relationship with increasing number of the minor, T allele (p for trend=0.042). Regression analysis also revealed the significant association between T allele of *MTHFR* C677T and the risk of having elevated LDL-C levels (≥ 130 mg/dL) [OR(95%CI) = 1.435 (1.073-1.920), $p=0.015$]. Such association was also significantly associated with the risk of having clinically low HDL-C levels [OR (95%CI) = 1.434 (1.039-1.978), $p=0.033$]. For *ADIPOQ* G276T, the decreasing levels of HDL-C levels was observed in relationship with increasing number of the minor, T allele (p -trend=0.042). The association between T allele of *ADIPOQ* G276T was also significantly associated with the risk of having clinically low HDL-C levels [OR(95%CI) = 1.351 (1.025-1.781), $p=0.033$]. The combined T allele carriers of both gene polymorphisms (CT+TT/GT+TT) increased the risk of having low HDL-C levels [OR(95%CI)=2.037 (1.215-3.417) $p=0.007$]. In conclusion, the risk variants of both genes which associated with the risk of blood lipids alteration may contribute to the risk of CVD.

คำสำคัญ: *MTHFR* (C677T) *ADIPOQ* (G276T) ระดับไขมันในเลือด ผู้สูงอายุ

Keywords: *MTHFR* (C677T), *ADIPOQ* (G276T), Blood lipid levels, Elderly

บทนำ

โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease, CVD) คือกลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปกติหรือมีพยาธิสภาพเกิดขึ้นกับระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยเฉพาะโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease, CAD) เป็นสาเหตุหลักของความเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในประชากรทั่วโลก [1] และจากรายงานข้อมูลของสำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่าประชากรไทยมีอัตราการเสียชีวิตจาก CAD ต่อประชากร 100,000 คนเพิ่มขึ้นจาก 55.20 % ในปี พ.ศ. 2555 เป็น 90.34% ในปี พ.ศ. 2557 [2] โดยสาเหตุหลักของ CAD เกิดจากภาวะ atherosclerosis ของหลอดเลือดแดงที่นำเลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ (coronary artery) Atherosclerosis มีพยาธิกำเนิดจากภาวะเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) ทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) ร่วมกับภาวะที่มีระดับไขมันชนิด low-density lipoprotein (LDL) สูงในกระแสเลือด ส่งผลให้เกิดการสะสมของ LDL ในชั้นใต้เซลล์บุผนังหลอดเลือด และจะเหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบ เกิดการสะสมเซลล์เม็ดเลือดขาวและเปลี่ยนสภาพเป็น “foam cells” การสะสมของ foam cells ในชั้นใต้เซลล์บุผนังหลอดเลือดจะแสดงลักษณะรอยโรคเป็น “fatty streak” ที่ผนังด้านในของหลอดเลือด รอยโรคดังกล่าวจะพัฒนาไปสู่พยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดที่เรียกว่า “atherosclerotic plaque” ซึ่งทำให้ช่องทางเดินภายในหลอดเลือดตีบแคบลง (luminal stenosis) [3-4]

มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นบนยีน *MTHFR* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ 5, 10-methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) พบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* ชนิด C677T (rs1801133) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 677 (บน coding sequence) จากไซโตซีน (Cytosine, C) ไปเป็นไทมีน (Thymine, T) ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 222 ของเอนไซม์ MTHFR จากอะลานีนเป็นวาลีน ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจาก MTHFR เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ โฮโมซิสเตอีน (homocysteine, Hcy) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงมีผลให้ระดับ Hcy ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น [5] จากการศึกษาของ Real JT และคณะ (2009) พบว่าจีโนไทป์ TT ของ *MTHFR* C677T มีค่าเฉลี่ยของระดับ Hcy สูงกว่าจีโนไทป์ CC และ CT อีกทั้งพบความสัมพันธ์ดังกล่าวกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ในเลือด [6] ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาในคนไทยพบว่าพาหะอัลลีล T (CT+TT) มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ Hcy ในเลือด [7] Hcy เป็นกรดอะมิโนที่เป็นผลผลิตมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทไธโอนีน (methionine) โดยปกติ Hcy สามารถถูกเปลี่ยนกลับเป็น methionine ผ่านกระบวนการ re-methylation pathway โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ methionine synthase (MS) ซึ่งต้องอาศัย 5-methyltetrahydrofolate ที่ได้จากการกระบวนการเมแทบอลิซึมของ folate ซึ่งควบคุมโดยเอนไซม์ MTHFR นอกจากนี้ Hcy จะถูกเปลี่ยนเป็น cysteine ผ่านกระบวนการ transsulphuration pathway โดยอาศัยเอนไซม์ cystathionine β -synthase (CBS) และ γ -cystathioninase [8] นอกจากนี้พบว่าปัจจัยอื่นๆ เช่น การสูบบุหรี่ ภาวะไตทำงานผิดปกติ รวมถึงการบริโภคอาหารที่มีปริมาณเมทไธโอนีนสูง มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ Hcy ในเลือด [9-10] ซึ่งภาวะโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูง (hyperhomocysteinemia) เป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ เนื่องจากโฮโมซิสเตอีนสูงขึ้นเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด ทำให้การหลั่ง NO ลดลง ส่งผลให้เกิด Endothelial dysfunction [11] นอกจากนี้โฮโมซิสเตอีนยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ endoplasmic reticulum stress ในเซลล์ด้วย มีผลเหนี่ยวนำให้เพิ่มการสังเคราะห์ Sterol regulatory element-binding protein -1 (SREBP-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทต่อกระบวนการสังเคราะห์ cholesterol และ triglyceride [12] นอกจากนี้ภาวะโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูงมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการแสดงออกของยีน *ApoA-I* ทำให้ปริมาณ ApoA-I ในเลือดต่ำ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการ reverse cholesterol transport (RCT) [13] ซึ่งเป็นกลไกทางสรีรวิทยาในการขนส่งโคเลสเตอรอลจากเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายไปกำจัดที่ตับ

ในทำนองเดียวกันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นบนยีน *ADIPOQ* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกในเซลล์ไขมัน (Adipocyte) ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างอะดิโปเนคติน (adiponectin) และหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด [14] พบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *ADIPOQ* ชนิด G276T (rs1501299) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 276 (บน intron) จากกวานีน (Guanine, G) เป็นไทมีน (Thymine, T) ซึ่งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (synonymous mutation) มีการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างโพลิมอร์ฟิซึม *ADIPOQ* G276T กับระดับอะดิโปเนคตินในเลือด โดยพบว่าพาหะอัลลีล T (GT+TT) และอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับระดับอะดิโปเนคตินในเลือดต่ำ [15-16] อีกทั้งพบว่า พาหะอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ HDL-C ในเลือด [17] นอกจากนี้พบว่ามีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น พฤติกรรมการสูบบุหรี่ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับอะดิโปเนคตินในเลือดต่ำ [18] ภาวะอ้วนซึ่งมีปริมาณเนื้อเยื่อไขมันในช่องท้อง (visceral fat) เพิ่มมากขึ้น และเซลล์ไขมันดังกล่าวมีขนาดใหญ่กว่าปกติ ส่งผลให้เพิ่มการสร้างและหลั่งโปรตีนชนิด tumor necrosis factor (TNF) α ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์อะดิโปเนคติน [19] นอกจากนี้พบว่าการออกกำลังกายควบคู่กับการบริโภคอาหารพลังงานต่ำ (hypocaloric diet) สัมพันธ์กับระดับอะดิโปเนคตินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น [20] อะดิโปเนคติน มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมระดับไขมัน

ในเลือด เมื่ออะดิโปเนคตินจับกับตัวรับจำเพาะ AdipoR1 และ AdipoR2 บนเยื่อหุ้มเซลล์กล้ามเนื้อ (skeleton muscle) และเซลล์ไขมัน (Adipocyte) จะกระตุ้น AMP-activated protein kinase (AMPK) ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetyl coenzyme-A carboxylase (ACC) อีกทั้งพบว่าอะดิโปเนคตินสามารถกระตุ้น peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) ส่งผลให้เพิ่มการเกิดปฏิกิริยา fatty acid oxidation กลไกดังกล่าวทำให้เกิดการสลายไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) [14] นอกจากนี้พบว่าระดับอะดิโปเนคตินมีความสัมพันธ์เชิงลบกับการทำงานของเอนไซม์ hepatic lipase [21] ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิปิดใน HDL particle ส่งผลให้มีการปลดปล่อย ApoA-I ออกมา และเพิ่มอัตราการสลาย ApoA1 (ApoA-I fractional catabolic rate) มีผลทำให้ระดับ HDL-C ในเลือดลดลง [22]

ผู้สูงอายุ เป็นวัยที่มีความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ โดยพบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับภาวะผนังหลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งเป็นผลมาจากผนังหลอดเลือดโดยเฉพาะอย่างยิ่งหลอดเลือดแดง มีปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้น และมีปริมาณเส้นใยอีลาสตินลดลง ปัจจัยดังกล่าวส่งผลให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง นอกจากนี้การทำงานของ endothelial cells ที่ผนังหลอดเลือดก็มีความผิดปกติ มีการสร้าง nitric oxide (NO) ลดลง ซึ่ง NO มีบทบาทสำคัญในการทำให้ smooth muscle ที่ผนังหลอดเลือดแดงมีการคลายตัว [23] นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าว ภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) ในผู้สูงอายุก็เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งการควบคุมระดับไขมันในเลือดให้อยู่ในสถานะที่เหมาะสมเป็นเป้าหมายในการลดความเสี่ยงต่อโรคดังกล่าว [24]

จากการที่โพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T สัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจ รวมทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวในผู้สูงอายุ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T (rs1801133) และ *ADIPOQ* G276T (rs1501299) กับระดับไขมันในเลือด ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดในประชากรไทยสูงอายุ

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T (rs1801133) และ *ADIPOQ* G276T (rs1501299) กับระดับไขมันในเลือด ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดในประชากรไทยสูงอายุ

วิธีการวิจัย

กลุ่มการศึกษา

ดำเนินการศึกษาในประชาชนไทย อายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไป จำนวนทั้งสิ้น 648 ราย โดยกำหนดเกณฑ์การคัดเข้าของอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการศึกษาวิจัย คือเป็นประชากรไทยสุขภาพดี ไม่มีอาการแสดงที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติทางคลินิก และไม่มีประวัติการรับยาโรคเบาหวาน ยาโรคความดันโลหิตสูง รวมถึงยาที่มีผลต่อระดับไขมันในเลือด ซึ่งได้รับการตรวจสุขภาพประจำปี ที่ศูนย์สุขภาพที่ 15 กรุงเทพมหานคร ระหว่างปี พ.ศ. 2558 ถึง พ.ศ. 2559 ทั้งนี้ผู้ที่มียาเป็นโรคตับอักเสบ โรคตับแข็ง และโรคไต รวมถึงผู้ที่ตรวจพบค่า TG สูงกว่า 400 mg/dL (เนื่องจากไม่สามารถคำนวณค่า LDL-C ด้วยวิธี Friedewald formula) จะถูกคัดออกจากกลุ่มการศึกษา โดยการศึกษานี้ได้ผ่านการตรวจสอบและได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสการรับรองเลขที่ HE60109

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากงานบริการตามปกติ ของศูนย์บริการสาธารณสุข 15 ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร และแบ่งเก็บในสารกันเลือดแข็ง Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และนำ packed cell มาใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอโดยชุดน้ำยา DNA isolation kit (Flexi Gene DNA kit; QIAGEN, Hilden, Germany) ส่วนซีรัมซึ่งเตรียมจากเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งถูกแยกเก็บเพื่อใช้ตรวจระดับไขมันในเลือดด้วยเครื่อง Cobas Integra 400 autoanalyzer สำหรับค่า low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ได้มาจากการคำนวณโดยใช้ Friedewald formula [$LDL-C = TC - HDL-C - (TG/5)$] ซึ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีค่า triglyceride (TG) สูงกว่า 400 mg/dL ไม่สามารถนำมาคำนวณได้เนื่องจากจะทำให้ผลการคำนวณที่ไม่ถูกต้อง สำหรับการตรวจระดับกลูโคสใช้ sodium fluoride เป็นสารกันเลือดแข็ง ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Cobas Integra 400 autoanalyzer

การตรวจ *MTHFR* ยีนโพลีมอร์ฟิซึม C677T (rs1801133)

ทำการตรวจจีโนไทป์ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยทำการสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) อ้างอิงจากการศึกษาของอิงครัตน์ และคณะ (2555) [7] โดยใช้ไพรเมอร์คู่ forward primer 5'-CCT TGA ACA GGT GGA GGC CAG-3' และ reverse primer 5'-GCG GTG AGA GTG GGG TGG AG-3' ได้สาย DNA ขนาด 294 base pairs (bp) จากนั้นนำสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์มาตัดด้วย restriction enzyme *HinfI* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 2.0% อากาโรสเจล (agarose gel) ซึ่งในกรณีของอัลลีล C จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 294bp ในขณะที่อัลลีล T เป็นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จำเพาะสำหรับเอนไซม์ *HinfI* ทำให้ถูกตัดได้แถบดีเอ็นเอขนาด 168bp และ 126bp ดังนั้นผลการตรวจ genotype ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T พบว่าจีโนไทป์ CC จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 294bp จีโนไทป์ CT ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 294 bp, 168 bp และ 126bp ส่วนจีโนไทป์ TT ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 168bp และ 126bp

การตรวจ *ADIPOQ* ยีนโพลีมอร์ฟิซึม G276T(rs1501299)

ทำการสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ forward primer 5'- GTT TTC CCA GTC ACG ACT ACA CTG ATA TAA ACT ATA TGG AG -3' และ reverse primer 5'- CCC CAA ATC ACT TCA GGT TG -3' อ้างอิงจากการศึกษาของ Mackevics et al (2006) [25] ได้สาย DNA ขนาด 126bp จากนั้นนำสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์มาตัดด้วย restriction enzyme *HinfI* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย electrophoresis บน 2.0% agarose gel ซึ่งในกรณีของอัลลีล G จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 126bp ในขณะที่อัลลีล T เป็นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จำเพาะสำหรับเอนไซม์ *HinfI* ทำให้ถูกตัดได้แถบดีเอ็นเอขนาด 126bp และ 84bp ดังนั้นผลการตรวจ genotype ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ADIPOQ* G276T พบว่าจีโนไทป์ GG จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 126bp จีโนไทป์ GT ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 126bp, 84bp และ 42bp ส่วนจีโนไทป์ TT ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 84bp และ 42bp

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 17 โดยทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประเภท continuous variable ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnov test ข้อมูลที่มีการกระจายตัวเบี่ยงเบน (skewed distribution) จาก normal distribution ดังนั้น ข้อมูลประเภทดังกล่าวจึงต้องแปลงค่าให้อยู่ในรูป log10 ก่อนทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ ด้วยวิธี parametric method [26] และแสดงผลค่าเฉลี่ยเป็นค่า geometric mean $\pm$ geometric SD

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้อมูลสองกลุ่มใช้วิธี independent sample t-test และระหว่างข้อมูลที่มีมากกว่าสองกลุ่มขึ้นไปใช้วิธี one-way ANOVA ส่วนข้อมูลเชิงกลุ่มวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Chi-square test และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ด้วยวิธี Logistic regression analysis เพื่อทำนายค่าความเสี่ยงโดยแสดงเป็นค่า odds ratio (OR) และค่าความเชื่อมั่นที่ 95% confident interval (95%CI) กำหนดการยอมรับระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

ผลตรวจจีโนไทป์และการกระจายความถี่ของจีโนไทป์

สำหรับความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T พบความถี่จีโนไทป์ CC มากที่สุด คือ ร้อยละ 68.1 รองลงมาคือจีโนไทป์ CT ร้อยละ 27.9 และจีโนไทป์ TT ร้อยละ 4.0 ตามลำดับ ส่วนความถี่อัลลีล (allele frequency) พบความถี่อัลลีล C ร้อยละ 82 และความถี่อัลลีล T ร้อยละ 18 สำหรับความถี่จีโนไทป์ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *ADIPOQ* G276T พบความถี่จีโนไทป์ GG มากที่สุด คือ ร้อยละ 49.7 รองลงมาคือจีโนไทป์ GT ร้อยละ 43.5 และจีโนไทป์ TT ร้อยละ 6.8 ตามลำดับ ส่วนความถี่อัลลีล พบความถี่อัลลีล G ร้อยละ 71.5 และความถี่อัลลีล T ร้อยละ 28.5 เมื่อทดสอบการกระจายตัวของจีโนไทป์ด้วยโปรแกรม Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies [27] พบว่าการกระจายความถี่จีโนไทป์ของ *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึม เป็นไปตามกฎ Hardy – Weinberg Equilibrium

การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดค่าตัวแปรทางคลินิกและค่าชีวเคมีในเลือด

ค่าเฉลี่ยตัวแปรทางคลินิกและค่าชีวเคมีในเลือดของกลุ่มประชากรศึกษา แสดงไว้ในตารางที่ 1 เมื่อแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็นกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี กับกลุ่มอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป ตามเกณฑ์จากรายงานของ Gray R et al. (2013) [28] เพื่อทดสอบว่าอายุอาจเป็นปัจจัยร่วมที่อิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือด พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ DBP, TC, HDL-C และ LDL-C ในกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี มีค่าสูงกว่ากลุ่มอายุตั้งแต่ 65 ปี ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่า SBP ในกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี มีค่าต่ำกว่ากลุ่มอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับ BMI, FBS และ TG (ตารางที่ 1)

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T กับการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือด

การเปรียบเทียบผลของ *MTHFR* C677T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมต่อค่าเฉลี่ยของระดับไขมันในเลือด ในกลุ่มประชากรทั้งหมด พบว่าการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ LDL-C สัมพันธ์กับจำนวนของอัลลีล T ของ *MTHFR* C677T ที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ CC (125.70 ± 1.39 mg/dL) CT (128.82 ± 1.33 mg/dL) และ TT (143.14 ± 1.39 mg/dL) ค่า p for trend เท่ากับ 0.042 ซึ่งความแตกต่างดังกล่าว เมื่อจำแนกตามกลุ่มอายุพบว่า มีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะกลุ่มผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป คือ CC (120.08 ± 1.39 mg/dL) CT (125.01 ± 1.35 mg/dL) และ TT (141.53 ± 1.39 mg/dL) ค่า p for trend เท่ากับ 0.035 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลของ *MTHFR* C677T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมต่อค่าเฉลี่ยของ TC, TG และ HDL-C ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1)

การเปรียบเทียบผลของ *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมต่อค่าเฉลี่ยของระดับไขมันในเลือด ในกลุ่มประชากรทั้งหมดพบว่าระดับ HDL-C มีแนวโน้มลดลงสัมพันธ์กับการมีจำนวนของอัลลีล T ที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ GG (55.09 ± 1.27 mg/dL) GT (53.38 ± 1.30 mg/dL) และ TT ($50.80 \pm 1.1.25$ mg/dL) ค่า p for trend เท่ากับ

0.042 เมื่อจำแนกตามกลุ่มอายุพบว่ากลุ่มผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป พบว่าการลดลงของระดับ HDL-C สัมพันธ์กับการ มีจำนวนของอัลลีล T เพิ่มขึ้น คือ GG ($54.70 \pm 1.27 \text{ mg/dL}$) GT ($52.17 \pm 1.30 \text{ mg/dL}$) และ TT ($49.49 \pm 1.24 \text{ mg/dL}$) ค่า p for trend เท่ากับ 0.043 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลของ *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมต่อค่าเฉลี่ยของ TC, TG และ LDL-C ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี regression analysis analysis ในกลุ่มประชากรทั้งหมด พบว่าจีโนไทป์ TT ของ *MTHFR* C677T สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ LDL-C ในเลือดสูง ($\geq 130 \text{ mg/dL}$ [24]) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR= 2.560, 95%CI=1.073-6.109, $p=0.034$) และพบความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์ด้วย dominant model (CT+TT vs CC, OR=1.410, 95%CI=1.005-6.109, $p=0.047$) ในทำนองเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ allelic model พบว่าอัลลีล T ของ *MTHFR* C677T สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ LDL-C ในเลือดสูง เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR=1.435, 95%CI=1.073-1.920, $p=0.015$) นอกจากนี้ พบว่าจีโนไทป์ TT ของ *MTHFR* C677T สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติ ($<40 \text{ mg/dL}$ สำหรับเพศชาย หรือ $<50 \text{ mg/dL}$ สำหรับเพศหญิง [29]) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR= 2.579, 95%CI=1.094-6.081, $p=0.045$) และเมื่อวิเคราะห์ด้วย allelic model พบว่าอัลลีล T ของ *MTHFR* C677T สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล C (OR=1.434, 95%CI=1.039-1.978, $p=0.028$) (ภาพที่ 2) ทั้งนี้ พบความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป (ภาพที่ 3-4) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติในกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* C677T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ TC และ TG

สำหรับ *ADIPOQ* G276T พบว่าจีโนไทป์ TT มีแนวโน้มสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติ (OR=1.825, 95%CI=0.919-3.623, $p=0.086$) และเมื่อวิเคราะห์ dominant model พบว่าพาหะอัลลีล T (GT+TT) สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR= 1.469, 95%CI=1.023-2.111, $p=0.037$) และเมื่อวิเคราะห์ด้วย allelic model พบว่าอัลลีล T ของ *ADIPOQ* G276T สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล G (OR=1.351, 95%CI=1.025-1.781, $p=0.033$) (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์จำแนกตามกลุ่มอายุ (ภาพที่ 4) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ TC, TG และ LDL-C

การศึกษาผลกระทบร่วม (combined effect) ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T กับการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือด

จากการศึกษาข้างต้นที่พบว่าพาหะอัลลีล T (GT+TT) ของ *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ และเมื่อศึกษาผลกระทบร่วมของทั้งสองโพลีมอร์ฟิซึมในกลุ่มประชากรทั้งหมด พบว่าจีโนไทป์ CT+TT/GT+TT สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CC/GG (OR=2.037, 95%CI=1.215-3.417, $p=0.007$) (ภาพที่ 5) และพบความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป (OR = 1.920, 95%CI= 1.032-3.571, $p=0.039$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อายุเป็นปัจจัยสำคัญที่สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยโครงสร้างของหลอดเลือดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การทำงานของหลอดเลือดผิดปกติ [23] นอกจากนี้ปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อความเสี่ยงดังกล่าว ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T กับระดับไขมันในเลือด ในเบื้องต้นพบว่า ความถี่จีโนไทป์ของ *MTHFR* C677T ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาความถี่สูงสุดคือ CC (68.2 %) รองลงมาคือ CT (27.8 %) และ TT (4.0 %) ซึ่งความถี่จีโนไทป์ดังกล่าวมีผลใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานในคนไทย [7] คือ (CC=76.4%, CT=21.3%, TT=2.3%) แต่แตกต่างจากรายงานในคนจีน (CC=26.5%, CT=47.8%, TT=25.7%) [30] ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่อาจแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ สำหรับความถี่จีโนไทป์ของ *ADIPOQ* G276T พบจีโนไทป์ GG มีความถี่สูงสุด (49.8 %) รองลงมาคือ GT (43.5 %) และ TT (6.7 %) ตามลำดับ ซึ่งความถี่จีโนไทป์นี้ให้ผลใกล้เคียงกับทั้งที่มีรายงานในคนไทย (GG=58.5%, GT=35.5%, TT=6%) [31] และคนญี่ปุ่น (GG=51.5%, GT=39.7%, TT=8.8%) [32]

การศึกษานี้พบความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* C677T ยีนโพลีมอร์ฟิซึมต่อค่าเฉลี่ยของระดับไขมันในเลือด โดยพบว่าระดับ LDL-C เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับจำนวนของอัลลีล T ของ *MTHFR* C677T ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อจำแนกตามอายุกลับพบความสัมพันธ์เฉพาะในผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับ LDL-C สอดคล้องกับการศึกษาของ Jiang S และคณะ (2014) ที่พบว่าระดับ LDL-C มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในจีโนไทป์ TT เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ CT และ CC [33] ทั้งนี้ยังมีการศึกษาที่บ่งชี้ว่าอัลลีล T ของ *MTHFR* C677T สัมพันธ์กับภาวะโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูง (hyperhomocysteinemia) [5] โดยภาวะดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ endoplasmic reticulum (ER) stress [12] ซึ่ง ER stress มีผลเหนี่ยวนำให้เพิ่มการสังเคราะห์ SREBP-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทต่อกระบวนการสังเคราะห์ cholesterol และ triglyceride ในเซลล์ตับ [34] และจากที่มีการศึกษาในหนูทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูงจะมีอัตราการขนส่ง triglyceride ในรูปของ very low-density lipoprotein (VLDL) ออกจากเซลล์ตับสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม [12] นอกจากนี้ภาวะโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูงยังมีอิทธิพลต่อกระบวนการ reverse cholesterol transport (RCT) โดยมีรายงานการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า เมื่อเติม โฮโมซิสเตอีนที่ความเข้มข้นสูงในเซลล์เพาะเลี้ยง ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน PPAR α และ ApoA-I ลดลง ในทำนองเดียวกันหนูทดลองกลุ่มที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมให้มีภาวะโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูง จะตรวจพบการแสดงออก *apoA-I* mRNA ลดลง รวมทั้งมีระดับโปรตีน ApoA-I และระดับ HDL-C ในซีรัมต่ำกว่าหนูกลุ่มปกติ [13, 35] กล่าวถึงกล่าวอาจเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของ *MTHFR* C677T กับระดับโฮโมซิสเตอีนและการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือด

นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล T ของ *ADIPOQ* G276T กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ HDL-C พบว่าระดับ HDL-C มีแนวโน้มลดลงสัมพันธ์กับการมีจำนวนของอัลลีล T ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อจำแนกตามอายุกลับพบความสัมพันธ์เฉพาะในผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา ของ Kawai T และคณะ (2013) พบว่าพาหะอัลลีล T (GT+TT) มีระดับ HDL-C ต่ำกว่าจีโนไทป์ GG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [17] ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล T ของ *ADIPOQ* G276T โพลีมอร์ฟิซึมกับการลดลงของระดับอะดิโปเนคติน (adiponectin) ในเลือด [16] ซึ่งอะดิโปเนคตินมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน มีรายงานความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับอะดิโปเนคติน กับระดับ HDL-C และระดับโปรตีน ApoA-I ในเลือด [21-22, 36] นอกจากนี้พบว่าระดับอะดิโปเนคตินมีความสัมพันธ์เชิงลบกับการทำงานของเอนไซม์ hepatic lipase [21] ซึ่งเอนไซม์ hepatic lipase

สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิปิดใน HDL particle ส่งผลให้มีการปลดปล่อย ApoA-I ออกมา และเพิ่มอัตรา
การสลาย ApoA1 (ApoA-I fractional catabolic rate) มีผลทำให้ระดับ HDL-C ในเลือดลดลง [22]

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า *MTHFR* C677T โพลีมอร์ฟิซึมสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ
LDL-C ในเลือดสูง และสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติ อีกทั้งพบว่า *ADIPOQ* G276T
โพลีมอร์ฟิซึมสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ และเมื่อศึกษาผลกระทบร่วม พบว่าพาหะอัลลีล
T (CT+TT/GT+TT) สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ต่ำ และพบความสัมพันธ์ดังกล่าวพบเด่นชัดเมื่อ
ทดสอบเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าอัลลีล T ของ *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T
โพลีมอร์ฟิซึมมีอิทธิพลร่วมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับ HDL-C ในเลือด ซึ่งอาจเป็นผลจากภาวะโฮโมซิสเตอีน
ในเลือดสูง ร่วมกับการลดลงของระดับอะดิโปเนคตินในเลือด ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวมีปัจจัยของอายุมาเกี่ยวข้อง

โดยสรุปการศึกษานี้บ่งชี้ความสัมพันธ์ ของยีนโพลีมอร์ฟิซึม *MTHFR* C677T (rs1801133) และ *ADIPOQ*
G276T (rs1501299) กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ LDL-C สูง และการมีระดับ HDL-C ต่ำ อาจสนับสนุนการเพิ่มความ
เสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยผลการศึกษานี้จะนำไปประยุกต์เพื่อเป็นแนวทางในการทำนาย
ความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในผู้สูงอายุ ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด ทั้งนี้
การศึกษานี้มีข้อจำกัดในการตรวจวัดระดับอะดิโปเนคติน ระดับโฮโมซิสเตอีน เนื่องจากปริมาณซีรัมไม่เพียงพอสำหรับ
ตรวจวัดส่งผลให้ไม่สามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์โดยตรงระหว่าง *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์
ฟิซึมกับค่าตัวแปรดังกล่าว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการทุกท่าน ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยหัวใจและหลอดเลือด คณะเทคนิค
การแพทย์ และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนครุภัณฑ์ อุปกรณ์ และสถานที่
ดำเนินการวิจัย งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนสนับสนุนการวิจัย
จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ IN60337) และนายศักดิ์ กันชาเลิศ ได้รับทุนพัฒนา จิต
ความสามารถในการทำวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Cardiovascular disease (CVDs) [online] 2016 [cited 2019 Apr 1]. Available from:
[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Non communicable disease data [online] 2015 [cited 2016 Apr 1]. Available from:
<http://www.thaincd.com/2016/mission/documents.php?tid=32&gid=1-020>
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature 2000; 407(6801): 233-241.
4. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2006; 47(8 Suppl): C7-12.
5. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for
vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10(1): 111-113.
6. Real JT, Martinez-Hervas S, Garcia-Garcia AB, Chaves FJ, Civera M, Ascaso JF, et al. Association of C677T
polymorphism in *MTHFR* gene, high homocysteine and low HDL cholesterol plasma values in heterozygous
familial hypercholesterolemia. J Atheroscler Thromb 2009; 16(6): 815-820.

7. Sarutipaboon I, Settasatian N, Settasatian C, Komanasin N, Kukongwiriyan U, Intharapetch P, et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms and homocysteine level in Thai patients with coronary artery disease. *J Med Tech Phy Ther* 2013; 25(1): 1-15. Thai.
8. Huang T, Yuan G, Zhang Z, Zou Z, Li D. Cardiovascular pathogenesis in hyperhomocysteinemia. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17(1): 8-16.
9. Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(7): 1927-1943.
10. Chen S, Wu P, Zhou L, Shen Y, Li Y, Song H. Relationship between increase of serum homocysteine caused by smoking and oxidative damage in elderly patients with cardiovascular disease. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015; 8(3): 4446-4454.
11. Lai WK, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutr Metab* 2015; 67(1): 1-12
12. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001; 107(10): 1263-1273.
13. Mikael LG, Genest J, Rozen R. Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. *Circ Res* 2006; 98(4): 564-571.
14. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26(3): 439-451.
15. Filippi E, Sentinelli F, Romeo S, Arca M, Berni A, Tiberti C, et al. The adiponectin gene SNP+276G>T associates with early-onset coronary artery disease and with lower levels of adiponectin in younger coronary artery disease patients (age ≤ 50 years). *J Mol Med (Berl)* 2005; 83(9): 711-719.
16. Cheung CY, Hui EY, Cheung BM, Woo YC, Xu A, Fong CH, et al. Adiponectin gene variants and the risk of coronary heart disease: a 16-year longitudinal study. *Eur J Endocrinol* 2014; 171(1): 107-115.
17. Kawai T, Ohishi M, Takeya Y, Onishi M, Ito N, Yamamoto K, et al. Adiponectin Single Nucleotide Polymorphism is a Genetic Risk Factor for Stroke Through High Pulse Wave Pressure: A Cohort Study. *J Atheroscler Thromb* 2013; 20(2): 152-160.
18. Miyazaki T, Shimada K, Mokuno H, Daida H. Adipocyte derived plasma protein, adiponectin, is associated with smoking status in patients with coronary artery disease. *Heart (British Cardiac Society)* 2003; 89(6): 663-663.
19. Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, Deuretzbacher G, et al. TNF- α alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm Metab Res* 2007; 39(4): 250-255.
20. Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, et al. Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. *Obes Res* 2003; 11(9): 1048-1054.
21. Schneider JG, von Eynatten M, Schiekofer S, Nawroth PP, Dugi KA. Low plasma adiponectin levels are associated with increased hepatic lipase activity in vivo. *Diabetes Care* 2005; 28(9): 2181-2186.
22. Verges B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F, et al. Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(6): 1364-1369.
23. Jackson CF, Wenger NK. Cardiovascular disease in the elderly. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64(8): 697-712.

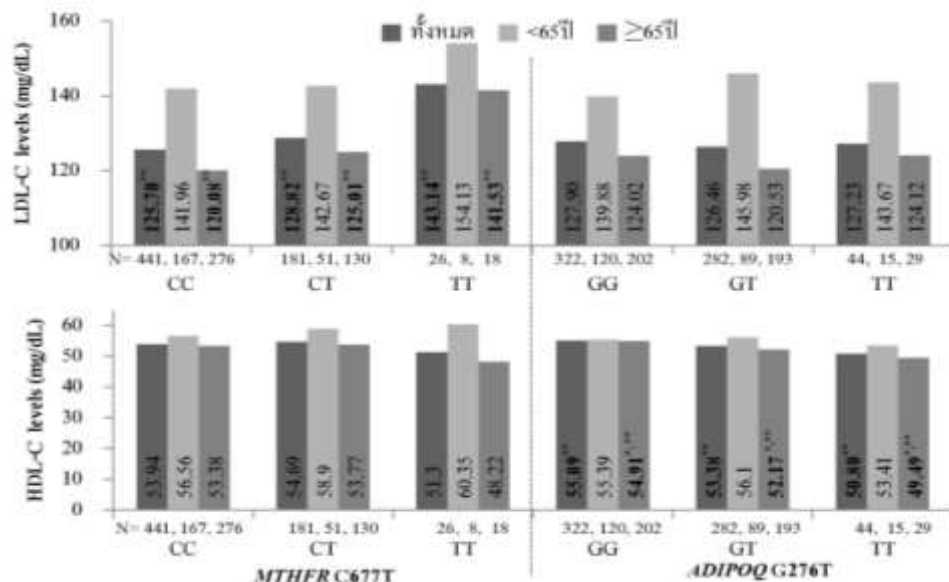


24. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 2002; 106(25): 3143-3143.
25. Mackevics V, Heid IM, Wagner SA, Cip P, Doppelmayr H, Lejnieks A, et al. The adiponectin gene is associated with adiponectin levels but not with characteristics of the insulin resistance syndrome in healthy Caucasians. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(3): 349-356.
26. Chirawatkul A. *Statistics for Health Science Research*. Bangkok: Witthayaphat; 2015. Thai.
27. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am J Epidemiol* 2009; 169(4): 505-514.
28. Gray R, Pattaravanich U, Chamchan C, Suwannoppakoa R. *New Concept of Older Presons: The Psycho-socia and Health Perspective*. Nakhonpathom: Institute for Population and Social Research, Mahidol University; 2013. Thai.
29. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120(16): 1640-1645.
30. Chen W, Hua K, Gu H, Zhang J, Wang L. Methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Scand J Immunol* 2014; 80(5): 346-353.
31. Zhan D, Yuktanandana P, Anomasiri W, Tanavalee A, Honsawek S. Association of adiponectin +276G/T polymorphism with knee osteoarthritis. *Biomed Rep* 2014; 2(2): 229-232.
32. Katakami N, Kaneto H, Matsuoka TA, Takahara M, Maeda N, Shimizu I, et al. Adiponectin G276T gene polymorphism is associated with cardiovascular disease in Japanese patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2012; 220(2): 437-442.
33. Jiang S, Zhao R, Pan M, Venners SA, Zhong G, Hsu YH. Associations of MTHFR and MTRR polymorphisms with serum lipid levels in Chinese hypertensive patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2014; 20(4): 400-410.
34. Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem* 2013; 288(26): 18707-18715.
35. Liao D, Tan H, Hui R, Li Z, Jiang X, Gaubatz J, et al. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ Res* 2006; 99(6): 598-606.
36. Ng TW, Watts GF, Farvid MS, Chan DC, Barrett PH. Adipocytokines and VLDL metabolism: independent regulatory effects of adiponectin, insulin resistance, and fat compartments on VLDL apolipoprotein B-100 kinetics? *Diabetes* 2005; 54(3): 795-802.

ตารางที่ 1 แสดงค่าระดับไขมันในเลือด และค่าตัวแปรทางคลินิก ในกลุ่มการศึกษาทั้งหมด และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี และตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป

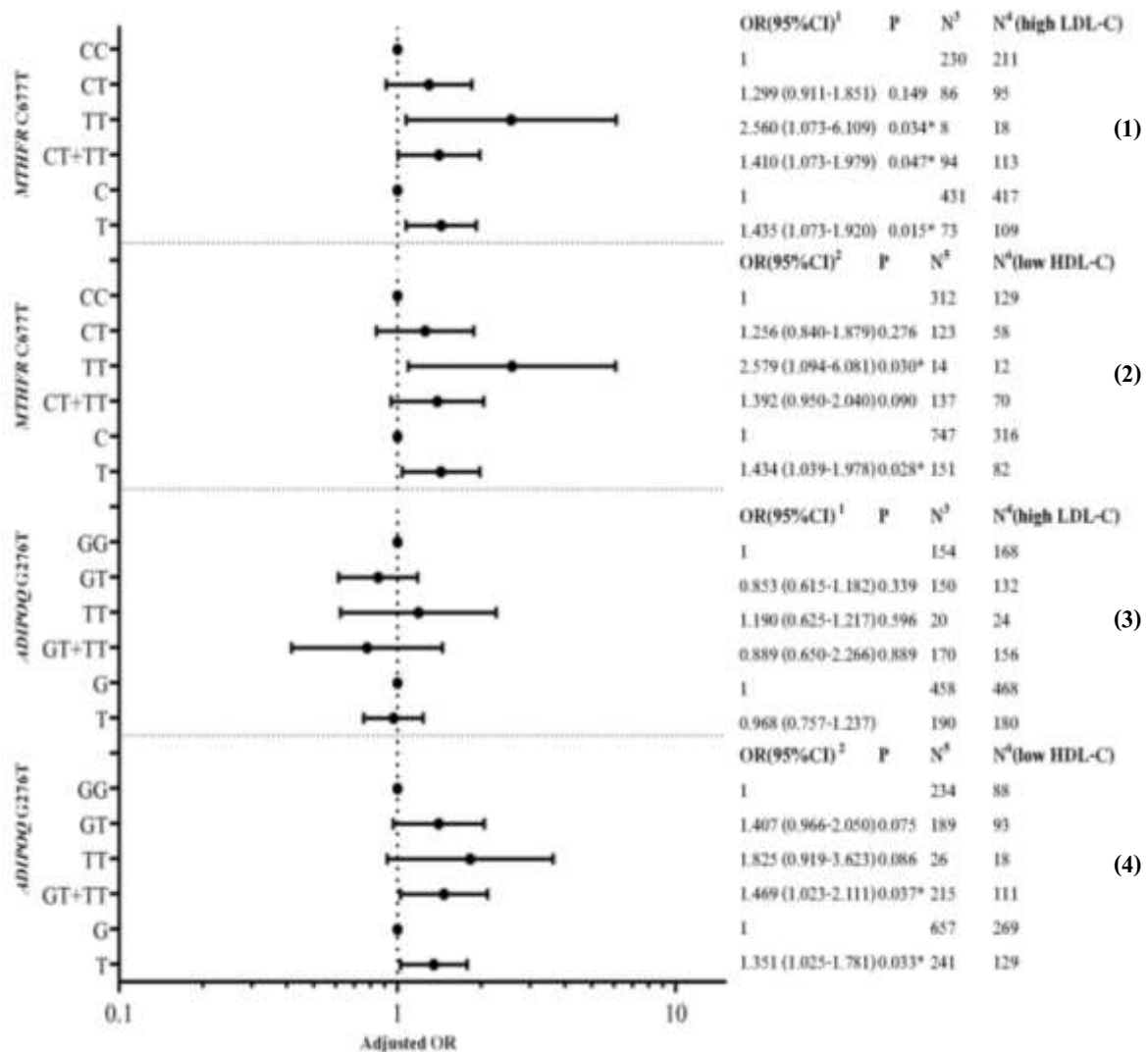
ค่าตัวแปรทางคลินิก และค่าสารชีวเคมีในเลือด	ค่าเฉลี่ยทั้งหมด (n=648)	ค่าเฉลี่ยจำแนกตามกลุ่มผู้สูงอายุ		P-value
		อายุ < 65 ปี (n=224)	อายุ ≥ 65 ปี (n=424)	
Age (year)	68.14±1.10	61.79±1.03	71.76±1.08	<0.001
BMI (kg/m ²)	24.31±1.18	24.56±1.18	24.19±1.18	0.262
SBP (mmHg)	134.13±1.16	131.09±1.14	135.76±1.16	0.004
DBP (mmHg)	75.77±1.17	77.27±1.15	74.99±1.18	0.017
FBS (mg/dL)	110.84±1.29	110.22±1.31	111.17±1.28	0.682
TC (mg/dL)	210.48±1.24	222.56±1.22	204.37±1.24	<0.001
TG (mg/dL)	117.75±1.55	121.83±1.57	115.65±1.54	0.153
HDL-C (mg/dL)	54.04±1.28	55.54±1.28	53.27±1.28	0.042
LDL-C (mg/dL)	127.23±1.37	136.84±1.34	122.42±1.38	<0.001
Obesity, n (%)	267 (41.2)	92 (41.1)	175 (41.3)	0.096
Hypertension, n (%)	498 (76.9)	157 (70.1)	341 (80.4)	0.003
Diabetes, n (%)	215 (33.2)	69 (30.8)	146 (34.4)	0.351
Dyslipidemia, n (%)	594 (91.7)	211 (94.2)	383 (90.3)	0.090
Male n (%)	133 (20.5)	40 (17.9)	93 (21.9)	
Female n (%)	515 (79.5)	184 (82.1)	331 (78.1)	0.222

ค่าเฉลี่ยแสดงในรูปแบบ geometric mean±geometric SD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี independent sample t-test การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มเพศใช้วิธี Chi-square test กำหนดการยอมรับระดับนัยสำคัญ ทางสถิติที่ P < 0.05



ภาพที่ 1 แสดงผลเปรียบเทียบระดับ HDL-C และ LDL-C ในเลือดกับ MTHFR C677T จีโนไทป์ และ ADIPOQ G276T จีโนไทป์ ทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA

*p value < 0.05, **p for trend < 0.05



ภาพที่ 2 แผนภูมิ Forest plot ค่า OR (1) (3) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T ยีน โพลีมอร์ฟิซึม กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ LDL-C ในเลือดสูงกว่าปกติ (2) (4) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T ยีน โพลีมอร์ฟิซึม กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติ ในกลุ่มประชากรทั้งหมด

¹ค่า OR ถูก adjusted สำหรับ confounder ได้แก่ age, gender, BMI

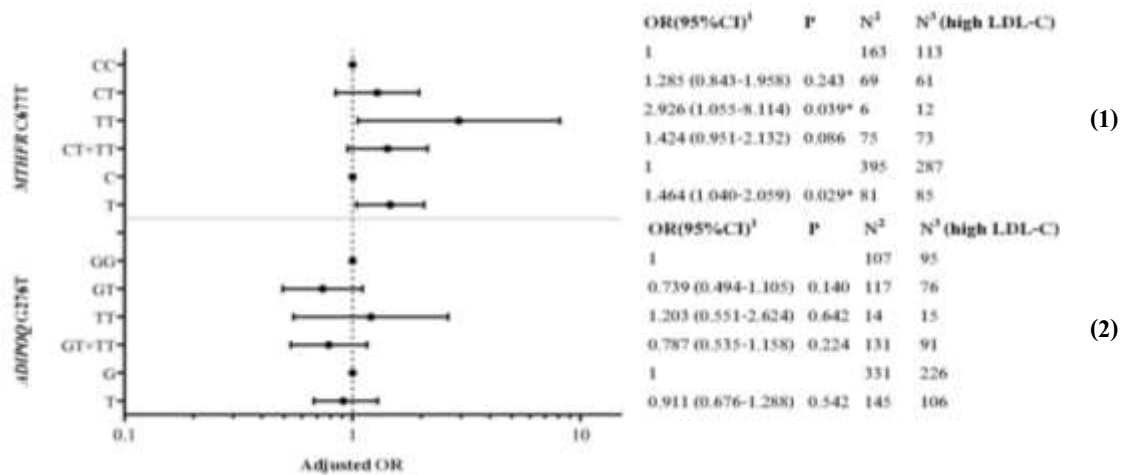
²ค่า OR ถูก adjusted สำหรับ confounder ได้แก่ age, gender, BMI และ TG

³จำนวน (n) กลุ่มระดับ LDL-C ปกติ (<130 mg/dl)

⁴จำนวน (n) กลุ่มระดับ LDL-C สูงกว่าปกติ (≥130 mg/dl)

⁵จำนวน (n) กลุ่มระดับ HDL-C ปกติ (≥40mg/dl สำหรับเพศชาย และ ≥50mg/dl สำหรับเพศหญิง)

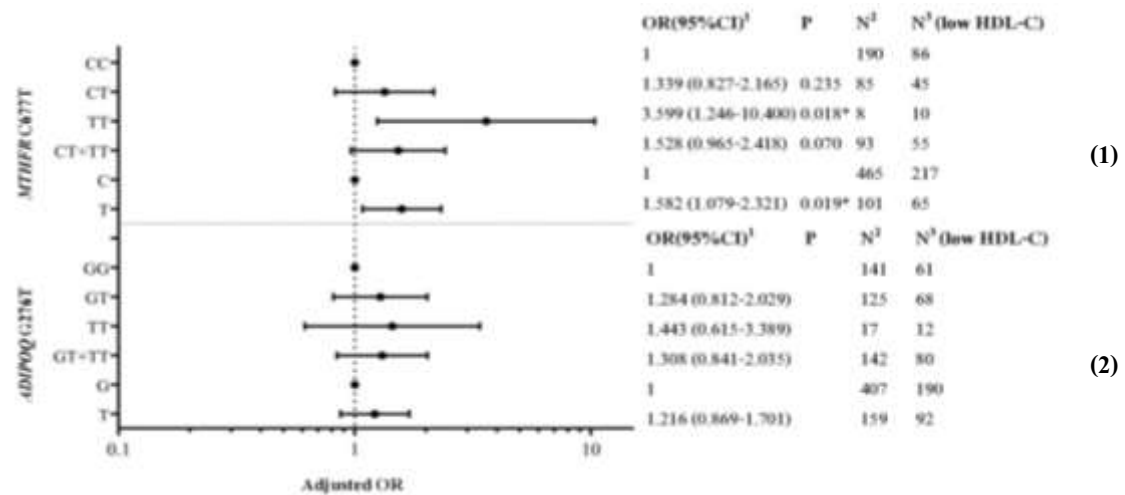
⁶จำนวน (n) กลุ่มระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ (<40mg/dl สำหรับเพศชาย และ <50mg/dl สำหรับเพศหญิง)



ภาพที่ 3 แผนภูมิ Forest plot ค่า OR (1) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* C677T และ (2) *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึม กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ LDL-C ในเลือดสูงกว่าปกติ ในกลุ่มอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป

¹ค่า OR ถูก adjusted สำหรับ confounder ได้แก่ gender และ BMI ²จำนวน (n) กลุ่มระดับ LDL-C ปกติ

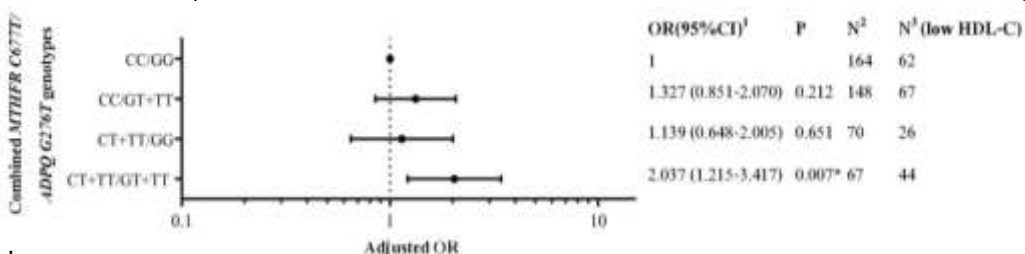
³จำนวน (n) กลุ่มระดับ LDL-C ≥ 130 mg/dl



ภาพที่ 4 แผนภูมิ Forest plot ค่า OR (1) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *MTHFR* C677T และ (2) *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึม กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติ ในกลุ่มอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป

¹ค่า OR ถูก adjusted สำหรับ confounder ได้แก่ gender, BMI และ TG ²จำนวน (n) กลุ่มระดับ HDL-C ปกติ

³จำนวน (n) กลุ่มระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ (<40mg/dl สำหรับเพศชาย และ <50mg/dl สำหรับเพศหญิง)



ภาพที่ 5 แผนภูมิ Forest plot ค่า OR แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลกระทบรวมของ *MTHFR* C677T และ *ADIPOQ* G276T ยีนโพลีมอร์ฟิซึม กับความเสี่ยงต่อการมีระดับ HDL-C ในเลือดต่ำกว่าปกติ ในกลุ่มประชากรทั้งหมด

¹ค่า OR ถูก adjusted สำหรับ confounder ได้แก่ age, gender, BMI และ TG ²จำนวน (n) กลุ่มระดับ HDL-C ปกติ

³จำนวน (n) กลุ่มระดับ HDL-C ต่ำกว่าปกติ (<40mg/dl สำหรับเพศชาย และ <50mg/dl สำหรับเพศหญิง)