บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลทั่วไปและระดับสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ มีตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 207 ราย อายุเฉลี่ย 47.8 ± 7.4 ปี เป็นเพศชาย 92 ราย คิดเป็นร้อยละ 44.4 และเพศหญิง 115 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.6 จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบอายุเฉลี่ยระหว่างเพศชาย (48.1 ± 8.1 ปี) และเพศหญิง (47.5 ± 6.9 ปี) ของกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยกลุ่มตัวอย่างประชากรที่ศึกษามีค่าเฉลี่ยของ body mass index (BMI) 24.3 ± 3.7 Kg/m^2 และมีค่าเฉลี่ยสารชีวเคมีในกระแสเลือดหลังจากอดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมงดังนี้ คือ glucose 95.2 ± 26.1 mg/dL, total cholesterol (TC) 214.6 ± 36.4 mg/dL, triglyceride (TG) 131.7 ± 69.9 mg/dL, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) 56.7 ± 13.9 mg/dL, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) 131.6 ± 32.8 mg/dL, aspartate aminotransferase (AST) 21.6 ± 6.8 U/L, alanine aminotransferase (ALT) 20.7 ± 10.0 U/L และ alkaline phosphatase (ALP) 70.7 ± 18.3 U/L นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าความดันโลหิตซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดพบว่ากลุ่มตัวอย่างประชากรที่ศึกษามีภาวะความดันโลหิตสูง โดยมีค่า systolic blood pressure (SBP) มากกว่าหรือเท่ากับ 140 mmHg และ/หรือ diastolic blood pressure (DBP) มากกว่าหรือเท่ากับ 90 mmHg จำนวน 84 ราย คิดเป็นร้อยละ 40.6 ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ข้อมูลทั่วไปและระดับสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มประชากรที่ศึกษา (n=207)

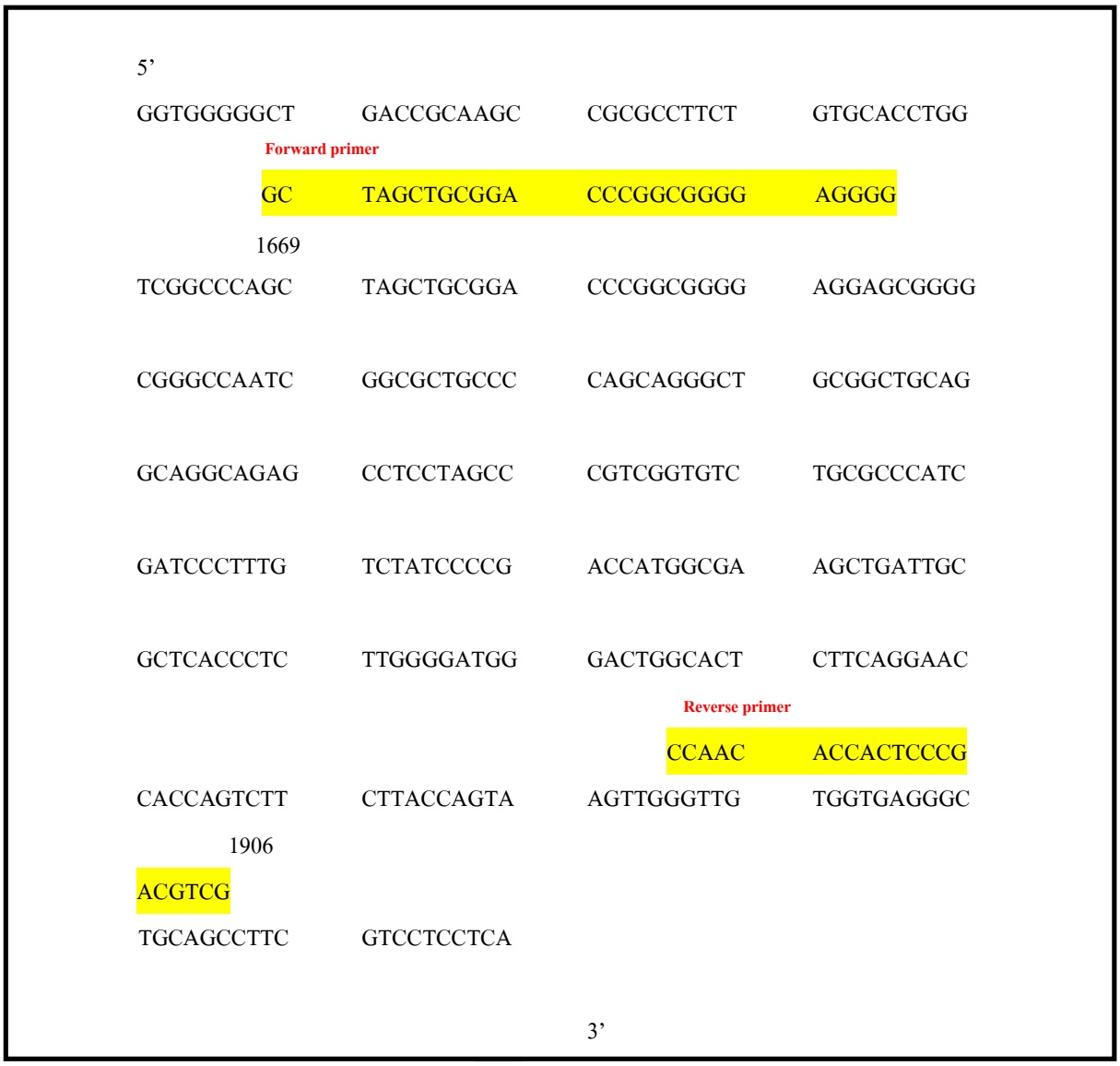
Characteristic	Mean ± SD
Age (year)	47.8 ± 7.4
Male (n [%])	92 (44.4%)
BMI (Kg/m^2)	24.3 ± 3.7
Hypertension (n [%])	84 (40.6%)
Glucose (mg/dL)	95.2 ± 26.1
Total cholesterol (mg/dL)	214.6 ± 36.4
Triglycerides (mg/dL)	131.7 ± 69.9
HDL-C (mg/dL)	56.7 ± 13.9
LDL-C (mg/dL)	131.6 ± 32.8
AST (U/L)	21.6 ± 6.8
ALT (U/L)	20.7 ± 10.0
ALP (U/L)	70.7 ± 18.3

4.2 การอ่านผล *PON1* polymorphisms ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R

การทำ PCR จะช่วยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่บรรจุ nucleotide ในตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันในแต่ละ polymorphism หลังจากย่อย PCR products ด้วย restriction endonuclease ชนิด BsrB I สำหรับ *PON1*-(T-108C) และ restriction endonuclease ชนิด Hinf I สำหรับ *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R) จากนั้นทำการตรวจสอบ genotype จากขนาดของ DNA fragments ที่ตัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

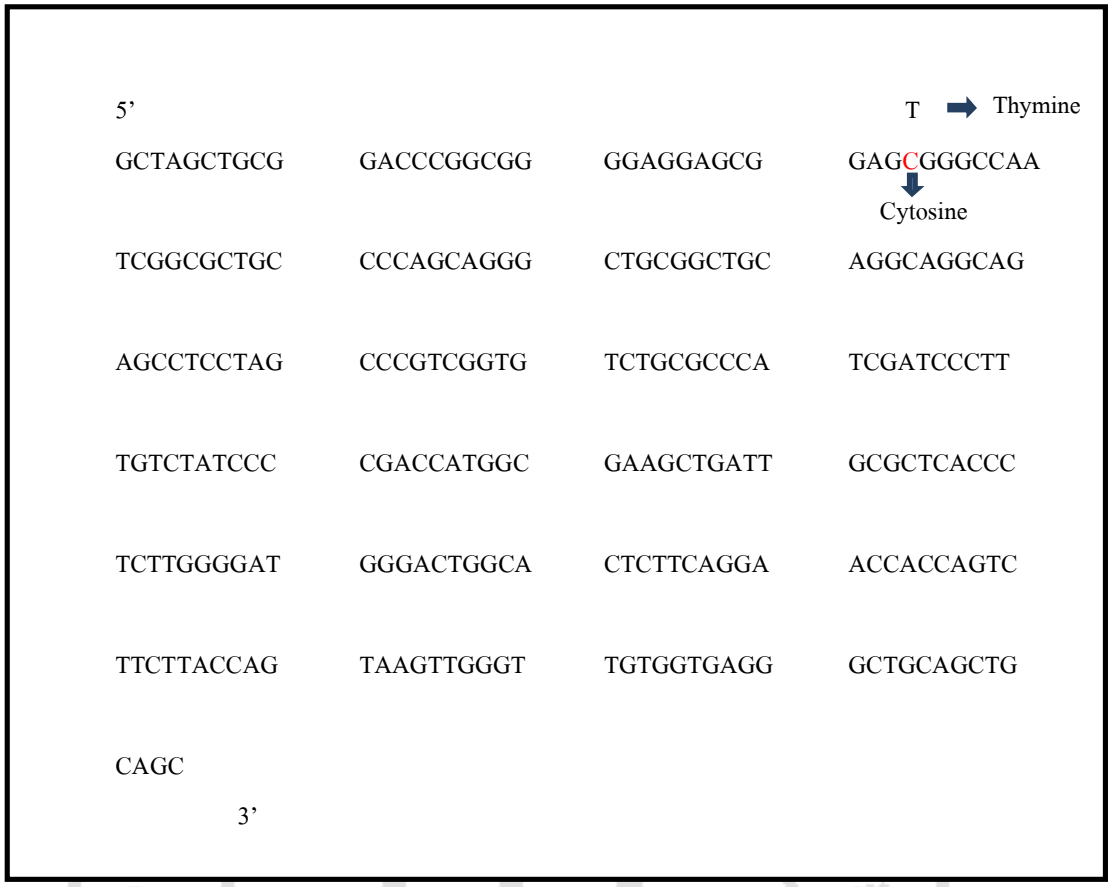
***PON1*-(T-108C) polymorphism**

ในกระบวนการ PCR ที่ใช้ *PON1*-(T-108C) primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 1669 ถึงตำแหน่ง 1906[(GenBank: AF539592.1)] ทำให้ได้ PCR products ขนาด 238 bp ดังภาพที่ 4



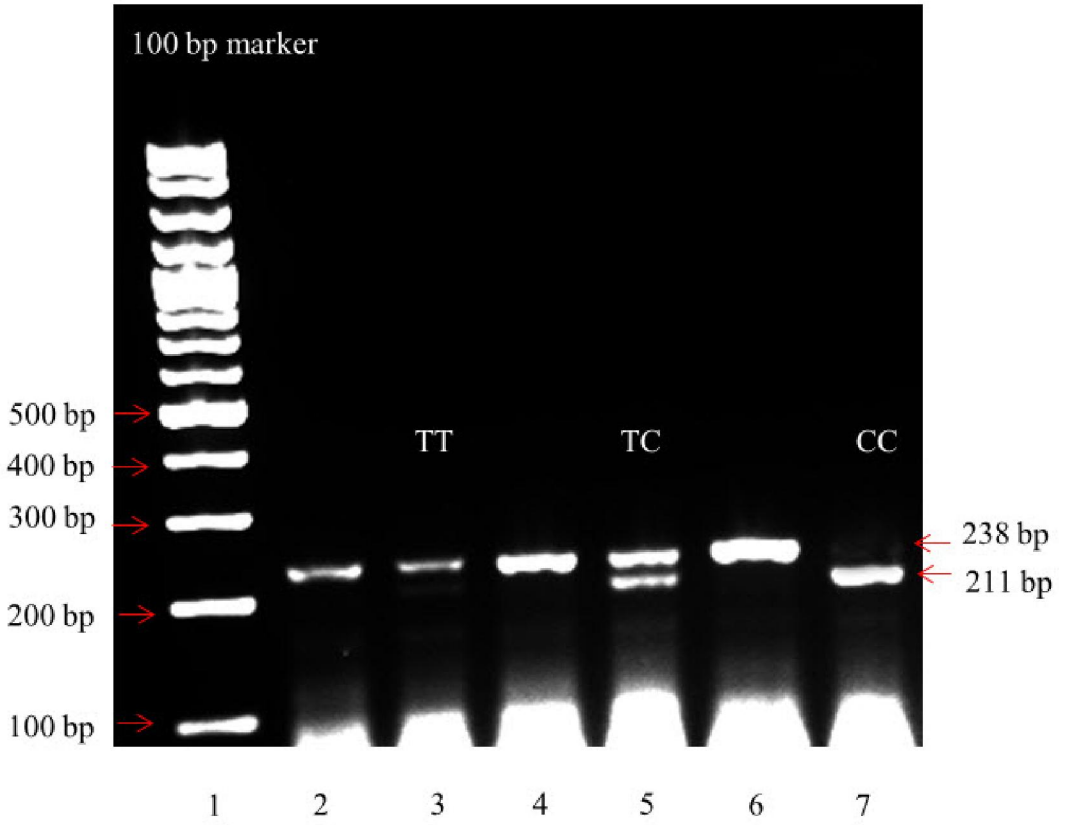
ภาพที่ 4 การจับของ primer บนสายของ DNA ตำแหน่ง 1669 ถึงตำแหน่ง 1906[(GenBank: AF539592.1)]

เอนไซม์ BsrB I จะตัดชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง GAG*CGG ซึ่งตรงกับตำแหน่ง codon ที่ -108 ของ *PON1* ซึ่งกำกับการสร้าง cytosine ดังภาพที่ 5 ถูกเอนไซม์ตัดได้เป็นชิ้นส่วน DNA ขนาด 211 และ 27 bp



ภาพที่ 5 การเกิด polymorphism ของลำดับเบส cytosine และ thymine ของ *PON1*-(T-108C)

ตัวอย่างที่มี genotype เป็น CC นั้น PCR products ทั้งหมดสามารถถูกตัดโดยเอนไซม์ BsrB I จึงพบ DNA fragment 2 แถบ ขนาด 211 bp และ 27 bp แต่เนื่องจากชิ้นส่วนที่ขนาด 27 bp นั้นเล็กมากจึงไม่สามารถมองเห็นได้บน 2.5% agarose gel ตัวอย่างที่มี genotype TT ไม่มีบริเวณ recognition site ของเอนไซม์ BsrB I จึงปรากฏชิ้นส่วน DNA ขนาด 238 bp เพียงแถบเดียว ในขณะที่ตัวอย่างที่มี genotype เป็น TC จะมี DNA บางส่วนที่ถูกตัด และบางส่วนไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ BsrB I จึงปรากฏเป็น DNA fragment 3 แถบ คือ ขนาด 27 bp, 211 bp และ 238 bp แต่แถบขนาด 27 bp มีขนาดเล็กมาก จึงทำให้ปรากฏ DNA fragment ที่มองเห็นบน agarose gel ได้เพียง 2 แถบ คือ ขนาด 211 bp และ 238 bp ดังภาพที่ 6



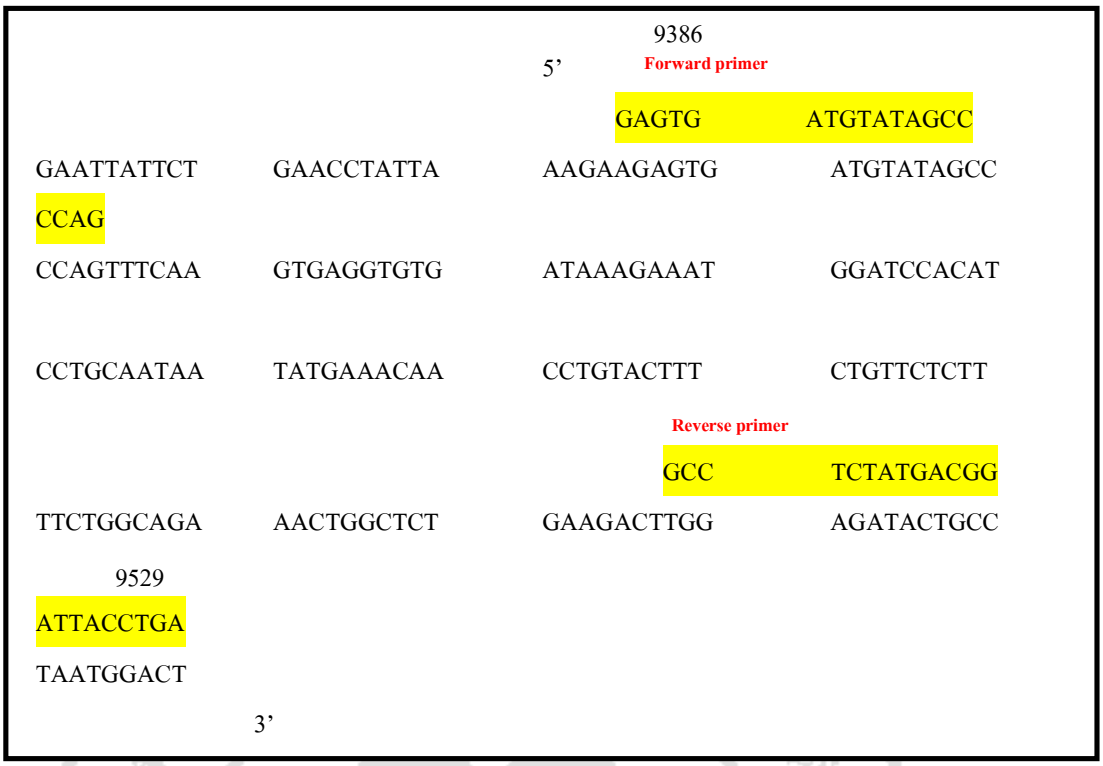
ภาพที่ 6 ลักษณะแถบ DNA ที่ตัดได้ของ genotype แบบต่างๆ ของ *PON1*-(T-108C)

แถวที่ 1 จากทางซ้ายมือ คือ 100 bp marker แถวที่ 3 คือ genotype TT แถวที่ 5 คือ TC และแถวที่ 7 คือ CC ส่วนแถวที่ 2, 4 และ 6 คือ PCR products ที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BsrB I

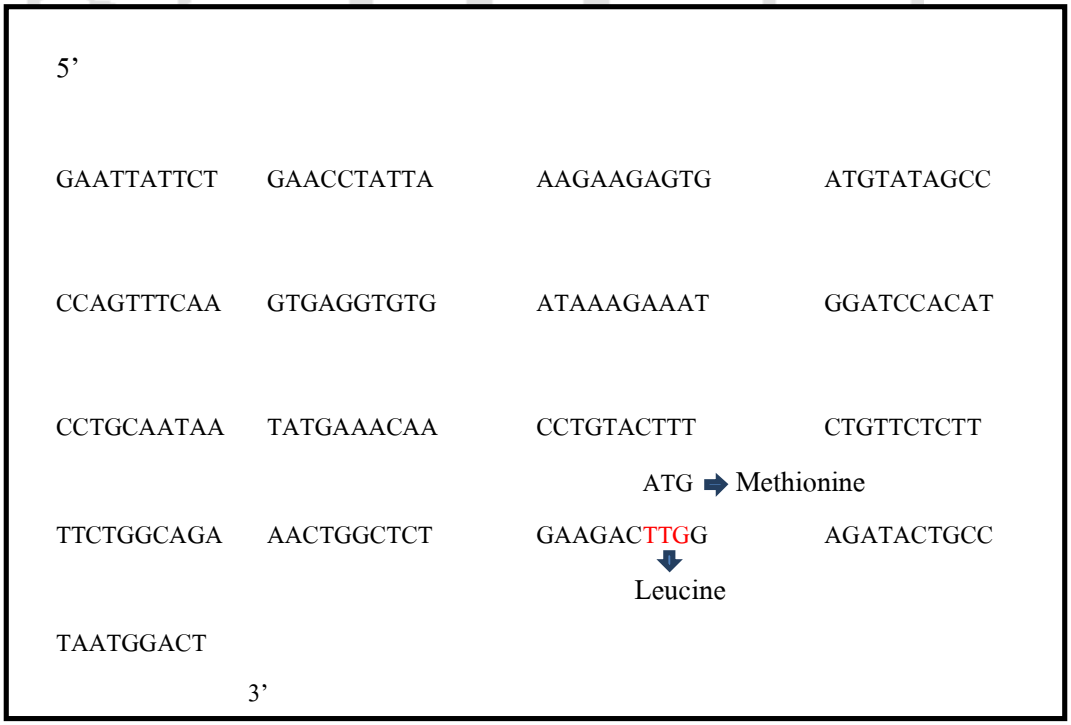
***PON1*-(L55M) polymorphism**

ในกระบวนการ PCR *PON1*-(L55M) primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 9386 ถึงตำแหน่ง 9529 [(GenBank: AF539592.1)] ทำให้ได้ PCR products ขนาด 144 bp ดังภาพที่ 7

เอนไซม์ Hinf I จะตัดชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง G*ANTC ซึ่งตรงกับตำแหน่ง codon ที่ 55 ของ *PON1* ซึ่งกำกับการสร้าง leucine (L) ดังภาพที่ 8 ถูกเอนไซม์ตัดได้เป็นชิ้นส่วน DNA ขนาด 22 bp และ 122 bp



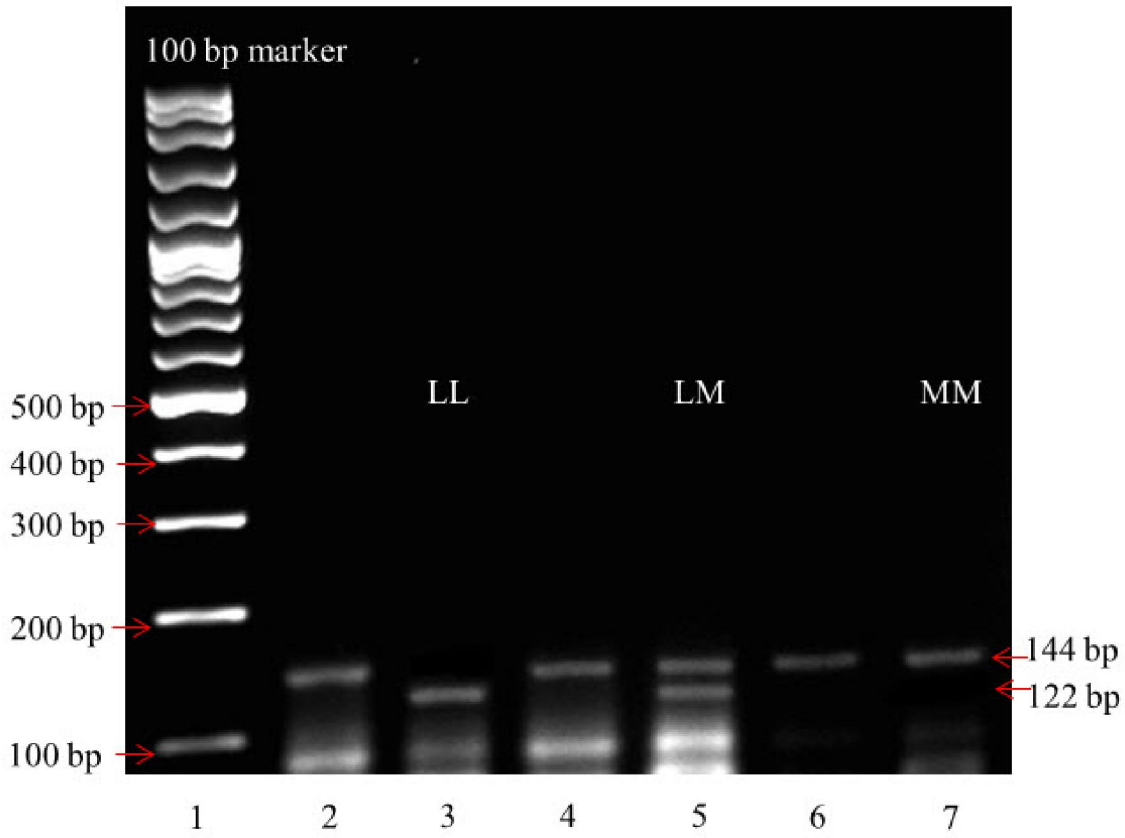
ภาพที่ 7 การจับของ primer บนสายของ DNA ตำแหน่ง 9386 ถึงตำแหน่ง 9529 (GenBank: AF539592.1)



ภาพที่ 8 การเกิด polymorphism ของลำดับเบส leucine และ methionine ของ *PON1*-(L55M)

ตัวอย่างที่มี genotype เป็น LL นั้น PCR products ทั้งหมดสามารถถูกตัดโดยเอนไซม์ Hinf I จึงพบ DNA fragment 2 แถบ ขนาด 22 bp และ 122 bp แต่เนื่องจากชิ้นส่วนที่มีขนาด 22 bp นั้นเล็ก

มาก จึงไม่สามารถมองเห็นได้บน 2.5% agarose gel ตัวอย่างที่มี genotype เป็น MM ไม่มีบริเวณที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ Hinf I จึงปรากฏ band ชิ้นส่วน DNA ขนาด 144 bp เพียงแถบเดียว ในขณะที่ตัวอย่างที่มี genotype เป็น LM จะมี DNA บางส่วนที่ถูกตัด และบางส่วนไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ Hinf I จึงปรากฏเป็น DNA fragment 3 แถบ คือ ขนาด 22 bp, 122 bp และ 144 bp แต่ band ขนาด 22 bp มีขนาดเล็กมาก จึงทำให้ปรากฏ DNA fragment ที่มองเห็นบน agarose gel ได้เพียง 2 แถบ คือ ขนาด 122 bp และ144 bp ดังภาพที่ 9

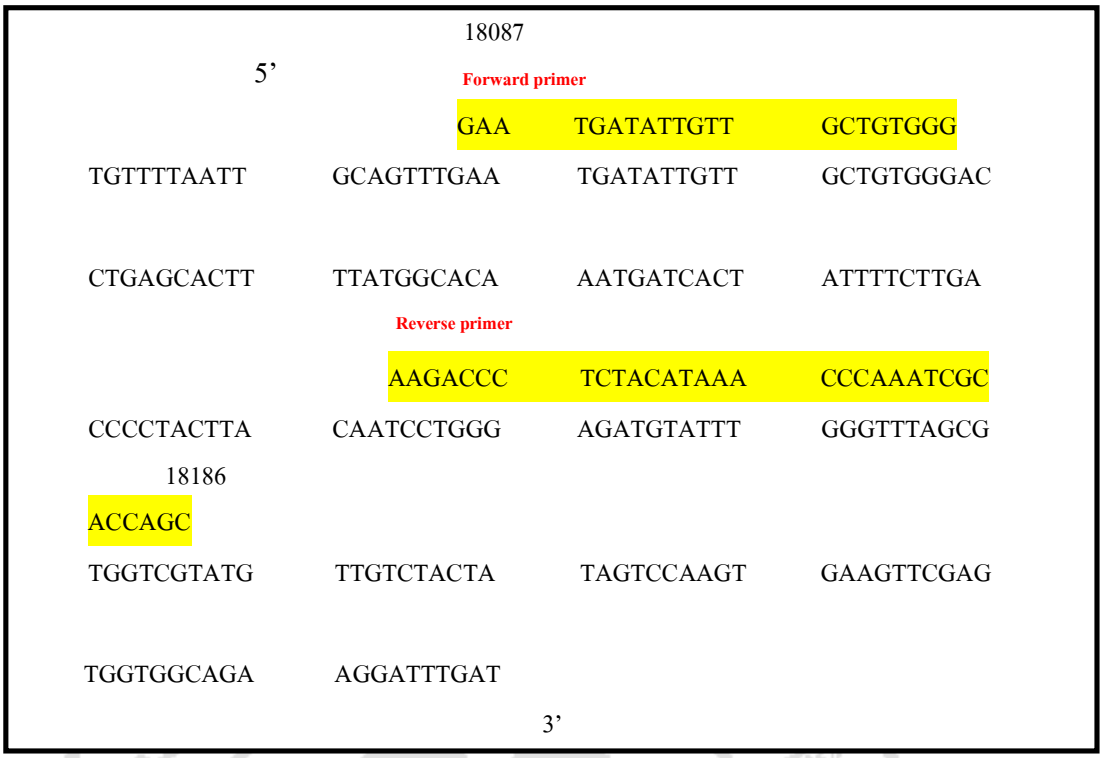


ภาพที่ 9 ลักษณะแถบ DNA ที่ตัดได้ของ genotype แบบต่างๆ ของ *PON1*-(L55M)

แถวที่ 1 จากทางซ้ายมือ คือ 100 bp marker แถวที่ 3 คือ genotype LL แถวที่ 5 คือ LM และแถวที่ 7 คือ MM ส่วนแถวที่ 2, 4 และ 6 คือ PCR products ที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hinf I

***PON1*-(Q192R) polymorphism**

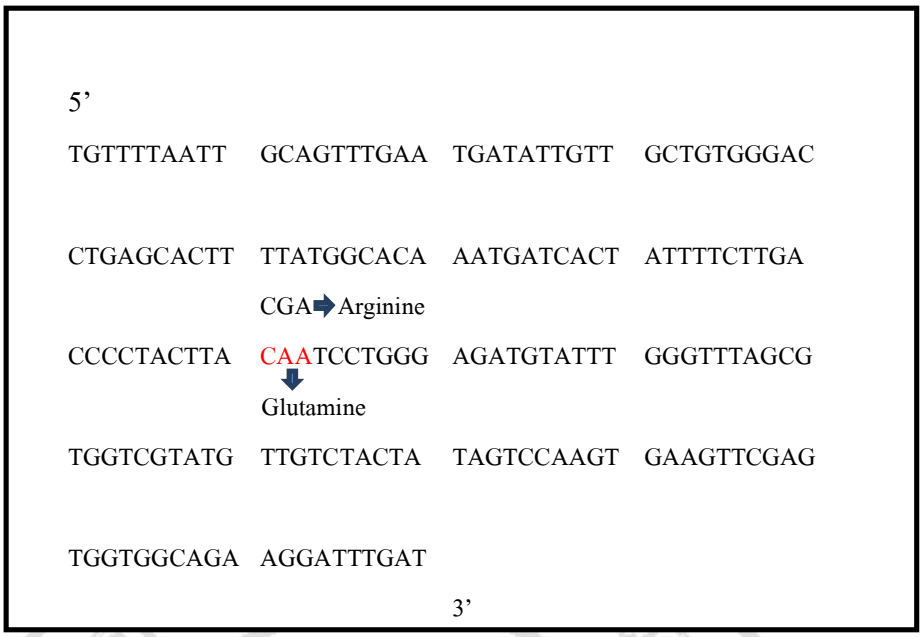
ในกระบวนการ PCR *PON1*-(Q192R) primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 18078 ถึงตำแหน่ง 18186[(GenBank: AF539592.1)] ทำให้ได้ PCR products ขนาด 109 bp ดังภาพที่ 10



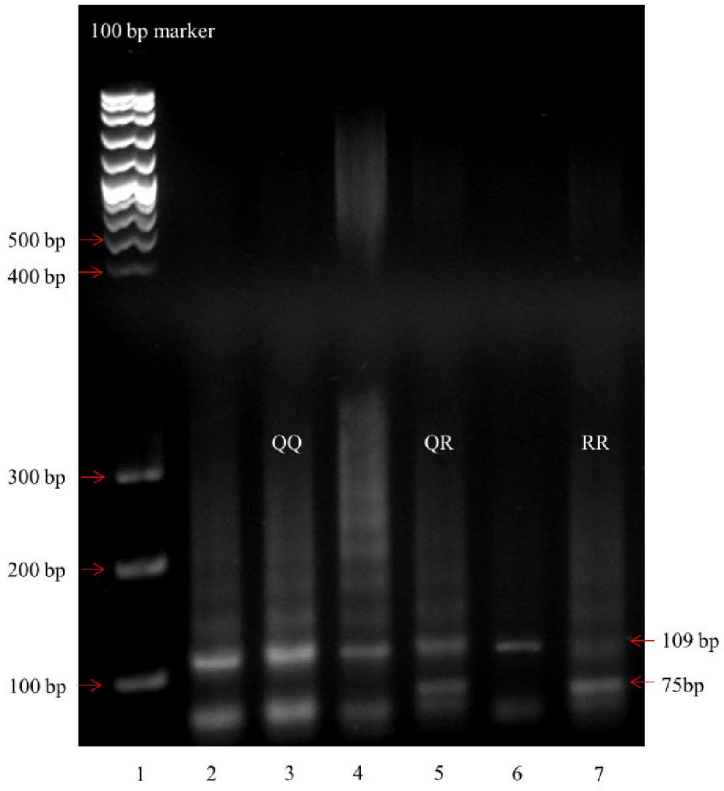
ภาพที่ 10 การจับของ primer บนสายของ DNA ตำแหน่ง 18087 ถึงตำแหน่ง 18186[(GenBank: AF539592.1)]

เอนไซม์ Hinf I จะตัดชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง G*ANTC ซึ่งตรงกับตำแหน่ง codon ที่ 192 ของ *PON1* ซึ่งกำกับการสร้าง glutamine (Q) ดังภาพที่ 11 ได้เป็นชิ้นส่วน DNA ขนาด 34 bp และ 75 bp

ตัวอย่างที่มี genotype เป็น RR นั้น PCR products ทั้งหมดสามารถถูกตัดโดยเอนไซม์ Hinf I จึงพบ DNA fragment 2 แถบ คือ ขนาด 34 bp และ 75 bp แต่เนื่องจากชิ้นส่วนที่มีขนาด 34 bp นั้นเล็กมาก จึงไม่สามารถมองเห็นได้บน 2.5% agarose gel ตัวอย่างที่มี genotype เป็น QQ ไม่มีบริเวณที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ Hinf I จึงปรากฏแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 109 bp เพียงแถบเดียว ในขณะที่ตัวอย่างที่มี genotype เป็น QR จะมี DNA บางส่วนที่ถูกตัด และบางส่วนไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ Hinf I จึงปรากฏเป็น DNA fragment 3 แถบ คือ ขนาด 34 bp, 75 bp และ 109 bp แต่แถบขนาด 34 bp มีขนาดเล็กมาก จึงทำให้ปรากฏ DNA fragment ที่มองเห็นบน agarose gel ได้เพียง 2 แถบ คือ ขนาด 75 bp และ 109 bp ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 11 การเกิด polymorphism ของลำดับเบส glutamine และ arginine ของ *PON1*-(Q192R)



ภาพที่ 12 ลักษณะแถบ DNA ที่ตัดได้ของ genotype แบบต่างๆ ของ *PON1*-(Q192R)

แถวที่ 1 จากทางซ้ายมือ คือ 100 bp marker แถวที่ 3 คือ genotype QQ แถวที่ 5 คือ QR และแถวที่ 7 คือ RR ส่วนแถวที่ 2, 4 และ 6 คือ PCR products ที่ไม่ได้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hinf I

4.3 การกระจายตัวของ *PON1* polymorphisms ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R

จากการศึกษาการกระจายตัวของ *PON1* polymorphisms ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R โดยสมการ Hardy-Wienberg (Hardy-Weinberg Equilibrium) พบว่าค่าความถี่ที่ observed ได้ของ genotype ตำแหน่ง T-108C แตกต่างจากความถี่ที่ expected โดยค่า $p < 0.05$ ในขณะที่ genotype ตำแหน่ง L55M และ Q192R ไม่แตกต่างจากความถี่ที่ expected โดยค่า $p > 0.05$ ดังตารางที่ 7

ผลการศึกษาการกระจายตัวของ *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง T-108C ในตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 207 ราย พบว่ามี genotype เป็น TT 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 22.2 genotype เป็น TC 131 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 63.3 และ genotype เป็น CC 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.5 ดังตารางที่ 8 และพบว่า allele T มีการกระจายตัวมากกว่า allele C โดยมีค่า allele frequency 0.54 และ 0.46 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของ genotype frequencies และ allele frequencies ระหว่างเพศชายและเพศหญิงของกลุ่มประชากรที่ศึกษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการศึกษาการกระจายตัวของยีน *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง L55M ในตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 207 ราย พบว่ามี genotype เป็น LL 118 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57.0 genotype เป็น LM 82 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.6 และ genotype เป็น MM 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.4 ดังตารางที่ 9 และพบว่า allele L มีการกระจายตัวมากกว่า allele M โดยมีค่า allele frequency 0.77 และ 0.23 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของ genotype frequencies และ allele frequencies ระหว่างเพศชายและเพศหญิงของกลุ่มประชากรที่ศึกษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการศึกษาการกระจายตัวของ *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง Q-192R ในตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 207 ราย พบว่ามี genotype เป็น QQ 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.8 genotype เป็น QR 106 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.2 และ genotype เป็น RR 87 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.0 ดังตารางที่ 10 และพบว่า allele Q มีการกระจายตัวน้อยกว่า allele R โดยมีค่า allele frequency 0.32 และ 0.68 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของ genotype frequencies และ allele frequencies ระหว่างเพศชายและเพศหญิงของกลุ่มประชากรที่ศึกษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 7 ค่าความถี่ genotype ของ *PON1* polymorphisms ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และQ192R เทียบกับค่าจาก Hardy-Weinberg Equilibrium

	Genotype frequency			
Parameters	Observed	Expected	Chi-square value	*p*-value
***PON1*-(T-108C)**				
TT	46	60.06	15.464	0.000
TC	131	102.88		
CC	30	44.06		
***PON1*-(L55M)**				
LL	118	122.13	2.703	0.259*
LM	82	73.74		
MM	7	11.3		
***PON1*-(Q192R)**				
QQ	14	21.69	5.958	0.051*
QR	106	90.63		
RR	87	94.69		

*ค่า $p > 0.05$ ถือว่าค่า genotype frequency ของ observed ไม่แตกต่างจากค่า genotype frequency ของ expected อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 8 การกระจายตัวของ *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง T-108C

	Male (n=92)	Female (n=115)	Total (n=207)
Genotype frequencies			
PON1-(T-108C)	TT : 18.5	TT : 25.2	TT : 22.2
	TC : 71.7	TC : 56.5	TC : 63.3
	CC : 9.8	CC : 18.3	CC : 14.5
Allele frequencies	T : 0.54	T : 0.53	T : 0.54
	C : 0.46	C : 0.47	C : 0.46

ตารางที่ 9 การกระจายตัวของ *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง L55M

	Male (n=92)	Female (n=115)	Total (n=207)
Genotype frequencies			
PON1-(L55M)	LL : 57.6	LL : 56.5	LL : 57.0
	LM : 35.9	LM : 42.6	LM : 39.6
	MM : 6.5	MM : 0.9	MM : 3.4
Allele frequencies	L : 0.76	L : 0.78	L : 0.77
	M : 0.24	M : 0.22	M : 0.23

ตารางที่ 10 การกระจายตัวของ *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง Q192R

	Male (n=92)	Female (n=115)	Total (n=207)
Genotype frequencies			
PON1-(Q192R)	QQ : 3.3	QQ : 9.6	QQ : 6.8
	QR : 54.3	QR : 48.7	QR : 51.2
	RR : 42.4	RR : 41.7	RR : 42.0
Allele frequencies	Q : 0.30	Q : 0.34	Q : 0.32
	R : 0.70	R : 0.66	R : 0.68

4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R) (Gene linkage and linkage disequilibrium)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R) โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis H test พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง *PON1* polymorphisms ที่ตำแหน่ง T-108C กับ Q192R โดยมีค่า $p < 0.001$

4.5 การเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีของยีน *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R)

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือด ได้แก่ glucose, total cholesterol, triglyceride, HDL-C และ LDL-C ของกลุ่มประชากรที่ศึกษาในแต่ละ genotype ของยีน *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R) ดังตารางที่ 11, 12 และ 13 ตามลำดับ พบว่า genotype แบบ TC มีระดับความเข้มข้นของ total cholesterol สูงกว่า genotype แบบ CC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ในขณะที่ประชากรที่มี genotype แบบ QR และ RR มีระดับความเข้มข้นของ HDL-C ต่ำกว่า QQ genotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และประชากรที่มี genotype RR มีระดับความเข้มข้นของ fasting blood sugar สูงกว่า QQ genotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือดระหว่าง genotype ของ ยีน *PON1* ที่ตำแหน่ง L55M

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีใน *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง T-108C

***PON1*-(T-108C)**	**TT (n = 46)**	**TC (n = 131)**	**CC (n = 30)**
Glucose (mg/dL)	97.4 ± 33.9	93.3 ± 17.6	100.4 ± 40.0
Total cholesterol (mg/dL)	214.1 ± 38.5	217.3 ± 33.5	203.1 ± 43.3[a*]
Triglyceride (mg/dL)	124.4 ± 52.3	133.5 ± 74.5	134.7 ± 73.5
HDL-C (mg/dL)	54.7 ± 13.3	57.7 ± 14.5	55.5 ± 11.9
LDL-C (mg/dL)	134.6 ± 32.9	133.0 ± 30.5	121.4 ± 40.9

a* Genotype แบบ TC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ genotype แบบ CC ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีใน *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง L55M

***PON1*-(L55M)**	**LL (n = 118)**	**LM (n = 82)**	**MM (n = 7)**
Glucose (mg/dL)	96.8 ± 31.2	92.4 ± 16.4	101.0 ± 22.6
Total cholesterol (mg/dL)	211.8 ± 35.9	216.4 ± 34.8	239.0 ± 53.7
Triglyceride (mg/dL)	129.3 ± 70.1	130.5 ± 66.4	185.0 ± 92.9
HDL-C (mg/dL)	56.3 ± 13.4	57.4 ± 14.8	54.0 ± 11.2
LDL-C (mg/dL)	129.8 ± 32.6	132.9 ± 30.3	148.0 ± 58.9

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีใน *PON1* polymorphism ที่ตำแหน่ง Q192R

***PON1*-(Q192R)**	**QQ (n = 14)**	**QR (n = 106)**	**RR (n = 87)**
Glucose (mg/dL)	86.1 ± 6.5	94.8 ± 25.8	97.1 ± 28.0 [b*]
Total cholesterol (mg/dL)	226.8 ± 25.6	213.6 ± 36.9	213.7 ± 37.0
Triglyceride (mg/dL)	129.1 ± 40.0	133.7 ± 76.3	129.6 ± 65.9
HDL-C (mg/dL)	68.5 ± 20.8	56.1 ± 12.5 [a*]	55.6 ± 13.7 [b*]
LDL-C (mg/dL)	134.8 ± 17.8	130.8 ± 33.8	132.2 ± 33.7

a* Genotype แบบ QQ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ genotype แบบ QR ที่ $p < 0.05$

a* Genotype แบบ QQ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ genotype แบบ RR ที่ $p < 0.05$