



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ความสามารถของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง ที่แยกได้จาก
ผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ต่อการต้านออกซิเดชันของ
ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำในหลอดทดลอง

โดย อาจารย์ ดร. ระวีพันธ์ มิ่งภักดิ์ และคณะ

ตุลาคม 2556

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180313

ชื่อโครงการ: ความสามารถของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ต่อการต้านออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำในหลอดทดลอง

ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร. ระวีพันธ์ มิ่งภักดิ์
ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: mraveenan@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 6 เดือน

บทคัดย่อ

ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (Hypertriglyceridemia) เป็นภาวะเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease, CVD) ผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมักมีระดับ HDL-Cholesterol ต่ำ HDL มีบทบาทในการยับยั้งการเกิด LDL-oxidation ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของ CVD ผ่านการทำงานของเอนไซม์ Paraoxonase-1(PON-1) ที่อยู่บนผิวของ HDL ในผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงนั้น Serum PON-1 activity จะต่ำกว่าคนปกติ ประกอบกับมีระดับ HDL ลดลง จึงทำให้อัตราเสี่ยงต่อ CVD สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของ HDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (n=10) ต่อการต้าน LDL-oxidation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับ HDL ที่แยกได้จากกลุ่มปกติ โดยการตรวจวัด Lipid peroxide ผลการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพของ HDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง มีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้ยังทำการทดสอบการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าปริมาณ Lag-time ของ LDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงนั้นมีแนวโน้มต่ำกว่าคนปกติ สรุปได้ว่าประสิทธิภาพของ HDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ในการยับยั้งการเกิด LDL-oxidation มีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจทำให้ผู้ที่มีภาวะนี้เสี่ยงต่อการเกิดโรค CVD เพิ่มขึ้น

Keywords : ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง เอชดีแอล แอลดีแอล-ออกซิเดชัน

Abstract

Project Code : MRG5180313

Project Title : Antioxidant capacity of hypertriglyceridemic HDL against Cu^{2+} -mediated LDL oxidation, *in vitro*.

Investigator : Dr. Raveenan Mingpakanee
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology,
Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University.

E-mail Address: mraveenan@yahoo.com

Project Period: 2 Years and 6 months

Abstract:

Cardiovascular disease (CVD) rapidly becoming the major cause of death in the developing world, including Thailand. One of the risk factors of CVD is hypertriglyceridemia. Patients with high levels of plasma triglycerides are commonly decrease in high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels. Previously, atherogenic protection of HDL was essentially focused on the reverse cholesterol transport. Recently, several studies have reported a protective effect of HDL against oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL). The aim of the present study was to evaluate the capacity of hypertriglyceridemic HDL against Cu^{2+} -mediated LDL oxidation, *in vitro* in comparison with control normolipemic subjects. The study that assessed 20 volunteers (10 hypertriglyceridemia, 10 normolipemia) age between 40-60 years was included. LDL oxidation (measured as lipid peroxide), antioxidant capacity of hypertriglyceridemic HDL against LDL oxidation (measured as %Inhibition of HDL against LDL oxidation) and serum paraoxonase activity were evaluated. By multivariate analysis, we found the HDL antioxidant capacity and serum paraoxonase activity tend to decline in hypertriglyceridemic patients compared with normal subjects. Furthermore, the LDL particles isolated from hypertriglyceridemic patients were prone to oxidize by Cu^{2+} -mediated, *in vitro*. These results suggest that antioxidative capacity of hypertriglyceridemic HDL is tend to decline in hypertriglyceridemic patients which increase the risk of developing CVD.

Keywords : Hypertriglyceridemia ,HDL, LDL-oxidation

I. Executive summary

Exclusive summary

โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease; CVD) เป็นโรคเรื้อรังที่มีค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลสูง และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นทุกปีในประเทศไทย การป้องกันโรคจึงเป็นหนทางที่ดีที่สุด การป้องกันโรค CVD สามารถทำได้โดย ลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้ ได้แก่ การสูบบุหรี่ การขาดการออกกำลังกาย การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ภาวะอ้วน และภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia)¹ ซึ่งรวมถึงภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (Hypertriglyceridemia) จากการศึกษาอุบัติการณ์ของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดพบว่า ผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง มีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิด CVD มากกว่าผู้ที่ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)²

Hypertriglyceridemia เป็น independent risk factor ต่อ CVD ที่สำคัญ จากการศึกษาของ The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM)³ พบว่า ผู้ที่มีระดับ Plasma triglycerides สูงกว่า 200 mg/dl จะมีอัตราเสี่ยงต่อ CVD นอกจากนี้ Hokanson รายงานว่า หากระดับ Plasma triglycerides สูงขึ้น 1 mmol/l (88.5 mg/dl) จะทำให้ผู้ชายมีอัตราเสี่ยงต่อ CVD เพิ่มขึ้น 32% และผู้หญิงมีอัตราเสี่ยงต่อ CVD เพิ่มขึ้นถึง 76%⁴ สำหรับภาวะอื่น ๆ ที่ทำให้ระดับ Plasma triglycerides สูง ได้แก่ ภาวะอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 Hyperinsulinemia เมื่อระดับ Plasma triglycerides เพิ่มขึ้น จะทำให้ระดับ HDL cholesterol ลดลง และ small, dense LDL เพิ่มขึ้น⁵

High-density lipoprotein หรือ HDL มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด หน้าที่สำคัญของ HDL คือ เก็บคอเลสเตอรอลส่วนเกินจาก peripheral tissues กลับคืนสู่ตับ (Reverse cholesterol transport) นอกจากนี้ HDL ยังสามารถป้องกันการเกิด oxidation ของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein, LDL) ซึ่งเป็นกลไกเริ่มต้นที่สำคัญของการสะสมไขมันในผนังหลอดเลือดหัวใจ จากการศึกษาพบว่าในโมเลกุล HDL มีเอนไซม์ที่สำคัญคือ paraoxonase 1 (PON 1) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านการเกิด LDL oxidation ผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง จะมีระดับ HDL-cholesterol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ระดับ PON 1 ในพลาสมาของผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงยังลดต่ำกว่าคนปกติ ปัจจัยเหล่านี้ จะเสริมให้อัตราเสี่ยงต่อการเกิด CVD ในผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงทวีความรุนแรงมากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสามารถของ HDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ต่อการต้าน LDL-oxidation ในหลอดทดลอง เพื่อตอบคำถามที่ว่า HDL ที่ได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง จะมีความสามารถต้าน LDL-oxidation เป็นอย่างไร และศึกษา LDL-oxidation ในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Hypertriglyceridemia และกลุ่มปกติ

ผลจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า LDL ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีแนวโน้มถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายกว่า LDL ที่ได้จากกลุ่มปกติ ซึ่งดูได้จากปริมาณ Lipidperoxide ที่เกิดจาก LDL-oxidation ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มปกติ ผลการศึกษาความสามารถของ HDL ต่อการต้าน LDL-oxidation ในหลอดทดลอง ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบความสามารถของ HDL ต่อการต้านออกซิเดชัน โดยคำนวณเป็น %Inhibition พบว่า HDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia มี %Inhibition มีแนวโน้มลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ ประกอบกับกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีระดับ HDL-cholesterol ลดต่ำกว่ากลุ่มปกติ จากผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าผู้ที่มีภาวะ Hypertriglyceridemia มีความเสี่ยงต่อการเกิด CVD มากกว่ากลุ่มปกติ เนื่องจากระดับ HDL-cholesterol ที่ลดลง และความสามารถของ HDL ในการต้าน LDL-oxidation มีแนวโน้มต่ำลงด้วย ซึ่งปัจจัยดังกล่าวยิ่งเสริมให้ผู้ที่มีภาวะ Hypertriglyceridemia มีความเสี่ยงต่อ CVD เพิ่มสูงขึ้น

II. วัตถุประสงค์

- 1 เพื่อศึกษา Lipoprotein profiles ของกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง เปรียบเทียบกับคนปกติ
- 2 เพื่อศึกษาผลของการออกซิเดชันของ LDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติในหลอดทดลอง
- 3 เพื่อศึกษาความสามารถของ HDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับ HDL ที่แยกได้จากกลุ่มปกติ
- 4 เพื่อศึกษาระดับ Serum PON activity ในซีรัมของกลุ่ม Hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ

III. Methodology

3.1 อาสาสมัคร

คัดเลือกอาสาสมัครเพศชาย อายุระหว่าง 40-60 ปี ที่เข้ารับการตรวจเลือดที่หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีเกณฑ์คัดเข้าดังนี้

กลุ่มผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์สูง (Hypertriglyceridemia; hyper TG) มีระดับ plasma triglycerides เมื่ออดอาหารนาน 10-12 ชั่วโมง สูงกว่า 200 mg/dl จำนวน 10 คน

กลุ่มปกติ มีระดับไขมันในเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ (Normolipidemia; normal) โดยมีระดับ Serum triglycerides ต่ำกว่า 150 mg/dl และระดับ Serum cholesterol ต่ำกว่า 200 mg/dl เมื่ออดอาหาร 10-12 ชั่วโมง จำนวน 10 คน

อาสาสมัครควบคุม (normal control subject) เป็นอาสาสมัครซึ่งมีระดับไขมันในเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ จำนวน 1 คน ซึ่งไม่อยู่ในกลุ่มทดลองใด ๆ เพื่อแยก Reference LDL Specimen สำหรับการทดสอบความสามารถในการต้าน oxidation ของ HDL ตลอดการทดลอง

ผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน ความดันสูง โรคหัวใจ โรคตับและโรคไต หรือสูบบุหรี่เป็นประจำจะไม่รับเข้าโครงการวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยได้ชี้แจงให้อาสาสมัครทราบถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยและความเสี่ยงที่เกิดขึ้นในกระบวนการวิจัย และอาสาสมัครลงนามยินยอมในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัยเป็นลายลักษณ์อักษร

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

อาสาสมัครทุกคนต้องเข้ารับการเก็บตัวอย่างเลือด 1 ครั้งตลอดการวิจัย ก่อนการเจาะเลือดอาสาสมัครต้องอดอาหาร 10-12 ชั่วโมง ทำการเจาะเลือดทางเส้นเลือดดำที่แขนจำนวน 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง ALC centrifuge PK110 ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดแดงทันทีเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา oxidation นำซีรัมไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

3.3 การแยกไลโปโปรตีน

ทำการแยกไลโปโปรตีนจาก serum ด้วยวิธี Sequential ultracentrifugation ด้วยเครื่อง Micro Ultracentrifuge HITACHI CS150GXL (Hitachi-KoKi, Japan) (รูปที่ 1) โดยวิธีการ ดังนี้



รูปที่ 1 เครื่อง Microultracentrifuge HITACHI CS150GXL (Hitachi-KoKi, Japan)

3.3.1 การแยก TRL (Triglyceride-rich lipoproteins) ซึ่งประกอบด้วย VLDL และ IDL มีความหนาแน่นอยู่ระหว่าง 1.006-1.019 g/ml ทำได้โดยปรับความหนาแน่นของซีรัมเป็น 1.019 g/ml แล้วบรรจุลงใน Ultra lock tube ใส่ลงใน rotor (รูปที่ 2) ปั่นที่ความเร็ว 140,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเก็บ TRL fraction ซึ่งเป็นสารละลายลอยอยู่ด้านบน ด้วย Tube slicing technique (รูปที่ 3)

3.3.2 การแยก LDL ความหนาแน่นของ LDL อยู่ระหว่าง 1.019-1.063 g/ml แยกได้โดยนำสารละลายที่เหลือจากการแยก TRL มาปรับความหนาแน่นเป็น 1.063 g/ml ปั่นที่ความเร็ว 140,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 นาที จากนั้นเก็บ LDL fraction ซึ่งเป็นสารละลายที่อยู่ด้านบนด้วย Tube slicing technique

3.3.3 การแยก HDL ความหนาแน่นของ HDL อยู่ระหว่าง 1.063-1.21 g/ml แยกได้โดยนำสารละลายที่เหลือจากการแยก LDL มาปรับความหนาแน่นเป็น 1.21 g/ml ปั่นแยกที่ความเร็ว 140,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นเก็บ HDL fraction ซึ่งลอยอยู่ด้านบนด้วย Tube slicing technique

สำหรับ LDL ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของ HDL ต่อการต้าน LDL-oxidation ซึ่งแยกจากอาสาสมัครควบคุมเพียงรายเดียวตลอดการทดลองซึ่งไม่ใช่อาสาสมัครกลุ่มทดลอง (Reference LDL specimen) แยกตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

A



B

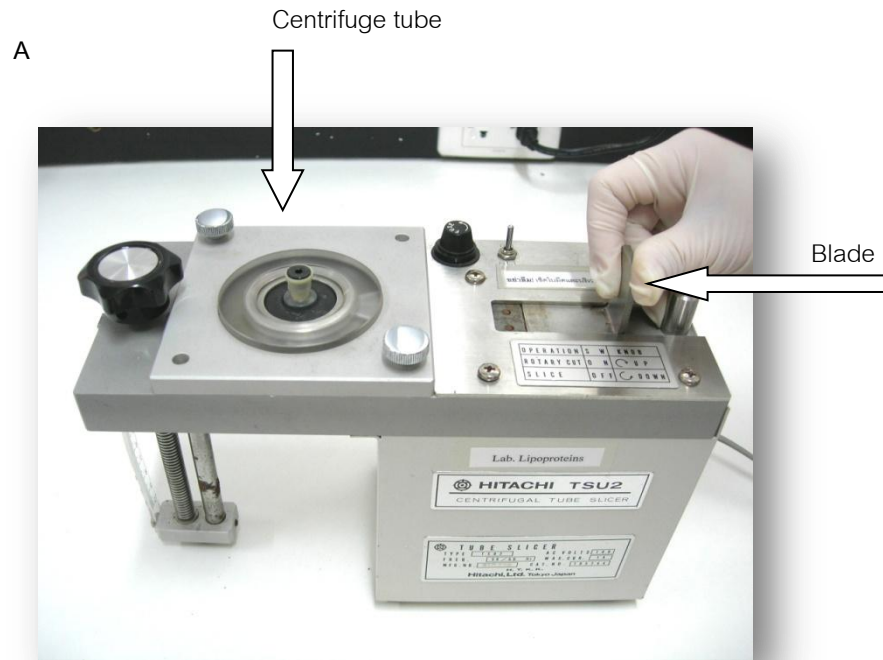


C

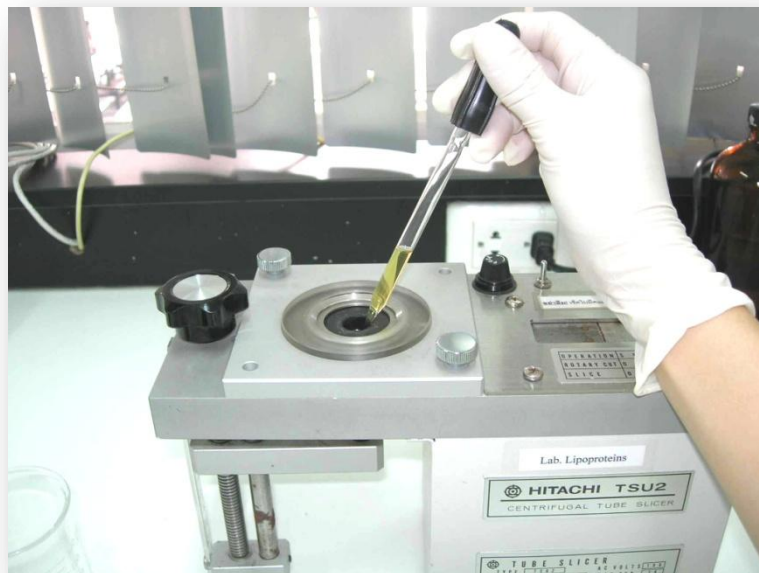


รูปที่ 2 Preparation of plasma for ultracentrifugation. A: ตูด plasma ใส่ลงใน centrifuge tube.

B: ปิด centrifuge tube ด้วย ultra-lock cap. C: วางลงใน rotor



B



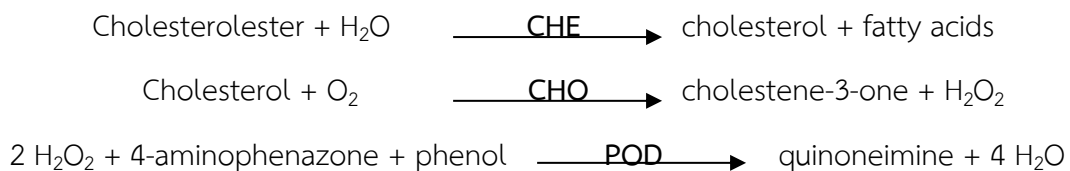
รูปที่ 3 การเก็บ lipoprotein fraction ด้วย tube slicing technique. **A:** วาง Centrifuge tube ลงใน slicer หลังจากนั้น ตัด Centrifuge tube ด้วยใบมีด **B:** ดูดเก็บ lipoprotein fraction ด้วย pasture pipette.

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Cholesterol และ Triglycerides ใน Lipoprotein fraction

ทำการวัดระดับ Total Cholesterol และ Triglycerides ทั้งในซีรัมและ Lipoprotein fractions ที่แยกได้จากข้อ 3.3 ด้วยหลักการ Enzyme colorimetric method โดยชุดน้ำยาของ Human (Germany) วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific)

3.4.1 การตรวจวัดปริมาณ Cholesterol

หลักการ Cholesterol ถูก Hydrolyzed ด้วย Cholesterol esterase (CHE) ที่เปลี่ยน Cholesterol ester ให้เป็น Cholesterol และ Fatty acid จากนั้น Cholesterol จะถูก oxidized ด้วยเอนไซม์ Cholesterol oxidase (CHO) ให้เป็น Cholestene-3-one และ Hydrogen peroxide (H_2O_2) และเมื่อ H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ 4-aminophenazone ในสถานะที่มี phenol และมีเอนไซม์ Peroxidase (POD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเกิดเป็นสาร Quinoneimine ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm. ปริมาณ Quinoneimine จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับ Cholesterol



การเตรียม Standard

ใช้ Standard ที่มีความเข้มข้นของ Cholesterol เป็น 0, 200 และ 400 mg/dl โดยเตรียมตามตาราง ดังนี้

Standard Concentration (mg/dl)	Standard reagent 200 (mg/dl)	Distilled Water (μ l)	Reagent (ml)
0	-	100	1
200	10	90	1
400	20	80	1

หลังจากเติม Reagent แล้วผสมให้เข้ากัน ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Evolution 300 ที่ความยาวคลื่น 500 nm.

ขั้นตอนการวัด Cholesterol ใน Lipoprotein fractions ต่างๆ

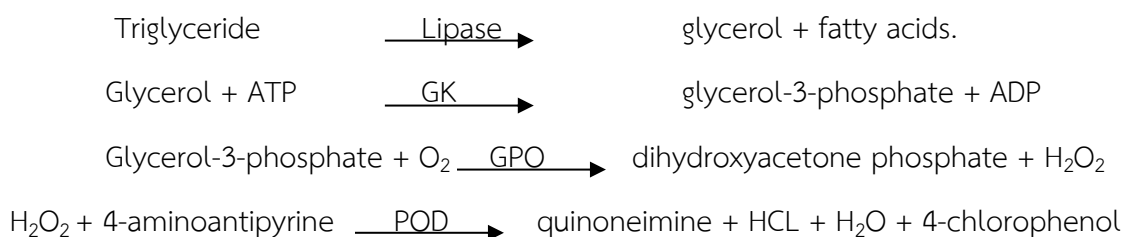
ทำการเติมสารตามตารางดังต่อไปนี้ คือ

Fractions	Sample (μ l)	Distilled Water (μ l)	Reagent (ml)
Serum	10	90	1
TRL	10	90	1
LDL	10	90	1
HDL	10	90	1

หลังจากเติม Reagent แล้ว ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Evolution 300 ที่ความยาวคลื่น 500 nm.

3.4.2 การวัดปริมาณ Triglycerides

หลักการ Lipase จะเปลี่ยน Triglycerides เป็น Glycerol กับ Fatty acid จากนั้น Glycerol จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ Glycerolkinase ในสถานะที่มีพลังงาน ทำให้เปลี่ยนไปเป็น Glycerol-3-phosphate จากนั้น Glycerol-3-phosphate ที่ได้จะถูก oxidized โดยเอนไซม์ Glycerol-3-phosphate oxidase ได้เป็น Dihydroxyacetone phosphate และ Hydrogen peroxide(H_2O_2) และเมื่อ H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ 4-aminoantipyrine โดยมีเอนไซม์ Peroxidase (POD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเกิดเป็นสาร Quinoneimine ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm. ปริมาณ Quinoneimine จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับ triglycerides



การเตรียม Standard

ใช้ Standard ที่มีความเข้มข้นของ Triglycerides เป็น 0, 200 และ 400 mg/dl โดยเตรียมตามตาราง ดังนี้

Standard Concentration (mg/dl)	Standard reagent 200 (mg/dl)	Distilled Water (μ l)	Reagent (ml)
0	-	100	1
200	10	90	1
400	20	80	1

หลังจากเติม Reagent แล้ว ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Evolution 300 ที่ความยาวคลื่น 500 nm.

ขั้นตอนการวัด Triglycerides ใน Lipoprotein fractions ต่างๆ

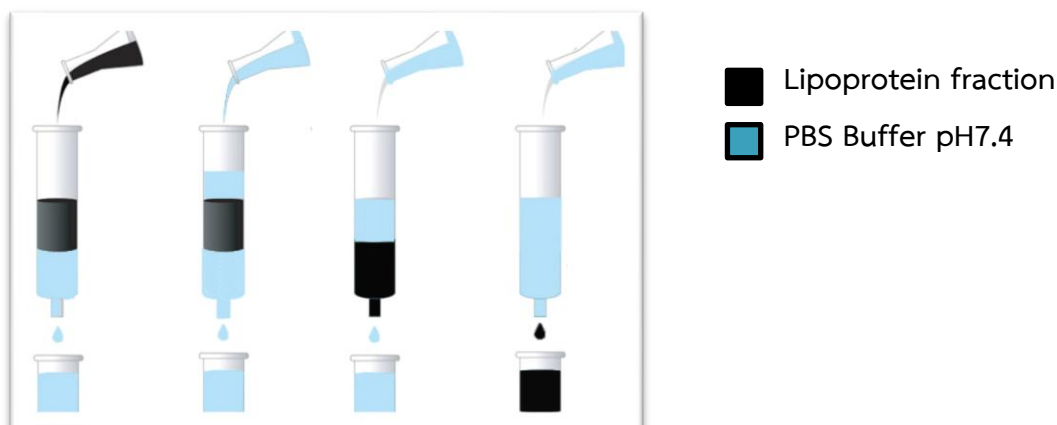
ทำการเติมสารตามตารางดังต่อไปนี้ คือ

Fraction	Sample (μ l)	Distilled Water (μ l)	Reagent (ml)
Serum	10	90	1
TRL	10	90	1
LDL	10	90	1
HDL	10	90	1

หลังจากเติม Reagent แล้วผสมให้เข้ากัน ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Evolution 300 ที่ความยาวคลื่น 500 nm.

3.5 การกำจัดสารละลาย KBr ออกจาก Lipoproteins

LDL และ HDL fractions ที่จะนำไปทดสอบต่อจำเป็นต้องกำจัด KBr และ EDTA ออกก่อน โดยใช้วิธี Size exclusion chromatography ทำได้โดย ผ่าน LDL หรือ HDL ลงไปใน PD-10 desalting column, Sephadex G25 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) ใช้ Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 0.01 M, pH7.4 เป็นตัวพา KBr ออกจาก Lipoproteins (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ขั้นตอนการกำจัด KBr และ EDTA ออกจาก LDL และ HDL fractions โดยใช้ desalting column, Sephadex G25

3.6 LDL susceptibility to oxidation, *in vitro*

การทดสอบปฏิกิริยา oxidation ของ LDL โดยใช้ Cu^{2+} เป็นตัวออกซิไดซ์ทำได้ดังนี้

3.6.1 นำ LDL ที่แยกได้จากอาสาสมัคร ปริมาณ 25 μg protein/ml จำนวน 500 μl แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x75 mm จำนวน 4 หลอด หลอดละ 100 μl เพื่อใช้ในการติดตามปฏิกิริยา oxidation ในช่วงเวลาที่ 0, 1, 2 และ 3

3.6.2 ทดสอบปฏิกิริยา oxidation โดยการเติม Start Reagent (CuSO_4) 5 μl เพื่อทำการเริ่มปฏิกิริยา

3.6.3 incubate ที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ ระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

3.6.4 เมื่อครบช่วงเวลาที่กำหนดในแต่ละหลอด (ช่วงเวลาที่ 1, 2 และ 3) ให้เติม Stop reagent 10 μl เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา วัดค่า lipid peroxide ที่เกิดขึ้นช่วงเวลาที่ 0, 1, 2 และ 3 จากการ oxidized LDL ที่ โดยวิธี FOX2 Assay⁶

* ในหลอดทดลอง แรกที่ชั่วโมงที่ 0 ให้หยุดปฏิกิริยาก่อนทันทีโดยเติม Stop reagent ทันทีหลังจากเติม Start reagent (CuSO₄) 5 µl

3.7 การศึกษาความสามารถของ HDL ในการยับยั้งปฏิกิริยา LDL-oxidation ในหลอดทดลอง

การทดสอบความสามารถของ HDL ในการยับยั้งปฏิกิริยา LDL-oxidation โดยทำการทดลอง 3 สภาวะ ดังนี้⁷

- 1) LDL oxidation ในสภาวะที่ไม่มี HDL โดยหาปริมาณ Lipid peroxide ที่เกิดจากการ oxidized normal LDL* ในสภาวะที่ไม่มี HDL [normal LDL* (25 mg protein / ml) + CuSO₄]
- 2) LDL oxidation ในสภาวะที่มี HDL โดยหาปริมาณ Lipid peroxide ที่เกิดจากการ oxidized normal LDL ในสภาวะที่มี HDL ซึ่งแยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia และ กลุ่มปกติ [normal LDL* (25 mg protein / ml) + HDL (50 mg protein / ml) + CuSO₄]
- 3) HDL oxidation โดยหาปริมาณ Lipid peroxide ที่เกิดจากการ oxidized HDL ซึ่งแยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia และ กลุ่มปกติ [HDL (50 mg protein / ml) + CuSO₄]

*normal LDL คือ LDL particle ที่แยกจาก normal control subject เพียง 1 คนตลอดการทดลอง

วัดปริมาณ lipid peroxides โดยวิธี FOX2 Assay จากปฏิกิริยา oxidation ที่เกิดขึ้นชั่วโมงที่ 0, 1, 2 และ 3 นำมาคำนวณ %Inhibition ตามสูตร

$$\%Inhibition = \frac{(LDL) + (HDL) - (LDL+HDL) \times 100}{(LDL) + (HDL)}$$

LDL = Lipid peroxides generated from normal LDL oxidation

HDL = Lipid peroxides generated from HDL oxidation

LDL+HDL = Lipid peroxides generated from LDL in the present of HDL

3.8 การวัดค่า Lipid Peroxide ด้วยวิธี FOX-2 assay

การหาปริมาณ lipid peroxide ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา oxidation ด้วยวิธี FOX-2 assay (Ferrous ion oxidation-xylene orange) โดยอาศัยหลักการของการ oxidized Fe²⁺ ไปเป็น Fe³⁺ ในสภาวะที่เป็นกรด จากนั้น Fe³⁺ ทำปฏิกิริยากับ Xylene orange เกิดเป็นสารประกอบของ Fe³⁺-

xylenol orange complex (สารสีส้ม) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer Biotek PowerWave 340 ที่ความยาวคลื่น 560 nm

การเตรียมน้ำยาสำหรับการวัดค่า Lipid peroxide

การวัดค่า Lipid peroxide จะใช้น้ำยา FOX-2 reagent โดยการเตรียมน้ำยาสามารถเตรียมได้ดังนี้

FOX-2 Reagent 100 ml ประกอบด้วย

- HPLC Methanol 90 ml
- BHT 88 mg
- Xylenol Orange 7.6 mg
- 25 mM H₂SO₄ 10 ml
- NH₄FeSO₆ 9.8 mg

การวัดค่า Lipid Peroxide

ในการวัดมีขั้นตอน คือ นำเอา lipoproteins ที่ผ่านการ oxidized ในชั่วโมงที่ 0, 1, 2 และ 3 จำนวน 20 µl แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 80 µl (เพื่อให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 µl) จากนั้นเติมน้ำยา FOX-2 Reagent 900 µl ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer Biotek PowerWave 340 ที่ความยาวคลื่น 560 nm เสร็จแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาค่า Lipid peroxide โดยใช้ค่า Molar extinction (E)

3.9 การวัด Serum Paraoxonase activity

การตรวจวัด Paraoxonase-1 activity ในซีรัมเป็นการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ Paraoxonase-1 (PON- 1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการป้องกันการเกิด LDL oxidation หลักการ คือ paraoxon เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ PON- 1 ในซีรัม โดยมี PON- 1 เป็นตัว hydrolyze paraoxon เกิดผลิตภัณฑ์เป็น *p*-nitrophenol ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm ผลที่ได้จะนำมาคำนวณหาค่า PON- 1 activity

การเตรียมน้ำยาสำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา

1. 20 mM Tris buffer/pH8 : Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 1211.4 mg ในน้ำกลั่น 500 ml
2. 1 mM CaCl₂ : CaCl₂ 110.99 mg ในน้ำกลั่น 500 ml
3. 5.5 mM Paraoxon : 23.76 µl ใน 1 mM CaCl₂ ใน 20 mM Tris buffer/pH8 ปริมาตร 20 ml

การตรวจวัด Serum Paraoxonase activity

นำซีรัมปริมาณ 10 µl เติมลงใน microtiter plate จากนั้นเติมน้ำยาที่เตรียมไว้ ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่อง spectrophotometer PowerWave 340 ที่ความยาวคลื่น 412 nm โดยวัดทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที

การคำนวณ

ค่า Paraoxonase activity ที่เป็นความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ (nmol/mL/min) โดยใช้ค่า Molar extinction coefficient

$$\text{Paraoxonase activity (nmol/mL/min)} = \frac{\text{Absorbance} \times 10^7}{1700/\text{M/cm.}}$$

* Molar extinction coefficient = 1700/M/cm.

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS Version 17.0 เพื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างกลุ่ม Normal และ กลุ่ม Hypertriglyceridemia โดยใช้สถิติ Unpaired *t-test*

IV. Results

4.1 Lipoprotein profiles ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ

ค่า lipoprotein profiles ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia และกลุ่มปกติแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่ากลุ่ม Hypertriglyceridemia จะมีค่า Serum Triglycerides, TRL-Triglycerides และ LDL-Triglycerides สูงกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และมีค่า Serum Cholesterol, TRL-Cholesterol และ LDL-Cholesterol สูงกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 1 แสดง Lipoprotein profile ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ

Lipoproteins (mg/dl)	Hypertriglyceridemia (n=20)	Normal (n=20)
Serum Triglyceride	337.68 ± 100.32*	80.18 ± 14.58
TRL- triglyceride	229.33 ± 85.85*	46.77 ± 17.99
LDL- triglyceride	49.14 ± 23.16*	14.13 ± 5.38
HDL- triglyceride	26.98 ± 16.41*	8.00 ± 2.66
Serum cholesterol	261.27 ± 64.15*	176.18 ± 19.18
TRL- cholesterol	93.52 ± 53.63*	15.91 ± 5.59
LDL- cholesterol	96.66 ± 22.38	93.28 ± 17.02
HDL- cholesterol	47.47 ± 12.49	46.58 ± 7.28

* ต่างจากกลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

TRL: Triglyceride-rich lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein

เมื่อทำการศึกษาสัดส่วนของ Total triglycerides / Total cholesterol ratio (TG/TC) ใน Lipoprotein particles พบว่า LDL และ HDL ที่แยกจากกลุ่ม Hypertriglyceridemia มี TG/TC ratio สูงกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตารางที่ 2 จากผลการศึกษาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า LDL และ HDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีลักษณะเป็น Triglyceride-rich LDL และ Triglyceride-rich HDL ตามลำดับ ซึ่งลักษณะดังกล่าว เป็น Atherogenic lipoproteins

ตารางที่ 2 แสดงค่า Triglycerides / total cholesterol ratio (TG/TC ratio) ของ lipoprotein ที่แยกได้จาก กลุ่ม Hypertriglyceridemia และ กลุ่มปกติ (Normolipidemia)

TG/TC ratio	Hypertriglyceridemia (n=20)	Normolipidemia (n=20)
TRL	4.03±2.68	4.59±2.13
LDL	0.52±0.23*	0.18±0.03
HDL	0.57±0.29*	0.26±0.04

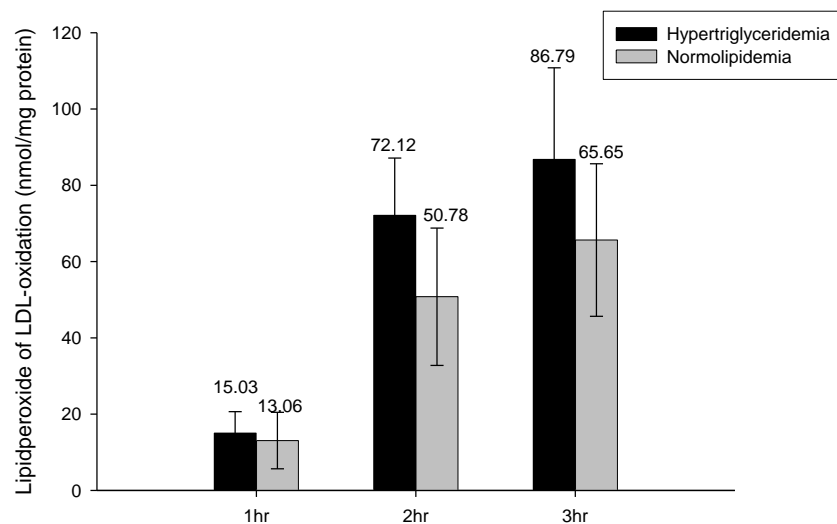
* ต่างจากกลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

TG/TC ratio: triglycerides / total cholesterol ratio; TRL: Triglyceride-rich lipoprotein;

LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein

4.2 LDL susceptibility to oxidation, *in vitro*

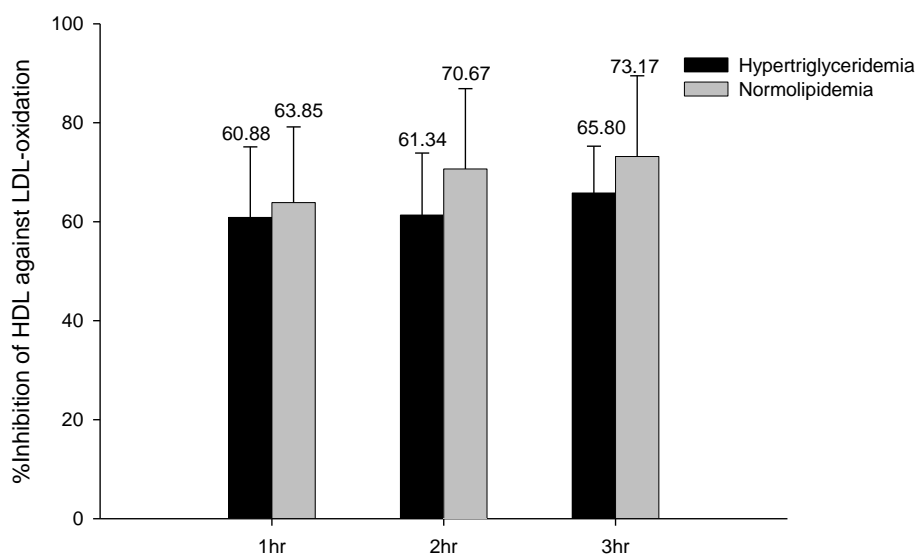
ทำการศึกษาความไวต่อการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในหลอดทดลอง โดยแยก LDL จากซีรัมของกลุ่ม Hypertriglyceridemia และกลุ่มปกติ หลังจากนั้น นำมา oxidized ในหลอดทดลองด้วย Cu^{2+} วัดค่า lipid peroxide ที่เกิดขึ้น ณ เวลาที่ 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังจาก oxidation โดยวิธี FOX2 Assay จากการศึกษาพบว่า ปริมาณ Lipid peroxide ที่เกิดขึ้นจากการ oxidized LDL ที่แยกได้จากกลุ่ม hypertriglyceridemia มีแนวโน้มสูงกว่าปริมาณ Lipid peroxide ที่เกิดขึ้นจากการออกซิไดซ์ LDL ที่แยกได้จากกลุ่มปกติ (รูปที่ 5) ผลการศึกษาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า LDL ของผู้ที่มีภาวะ hypertriglyceridemia จะมีแนวโน้มถูก Oxidized ได้ง่ายกว่า LDL ของกลุ่มปกติ



รูปที่ 5 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณ Lipid peroxide ที่เกิดจากการออกซิไดซ์ LDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะ hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับคนปกติ

4.3 การศึกษาความสามารถของ HDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia ในการยับยั้งปฏิกิริยา LDL-oxidation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ (HDL inhibitory capacity on LDL oxidation, *in vitro*)

ทำการศึกษาความสามารถของ HDL ในการยับยั้งปฏิกิริยา LDL-oxidation ในหลอดทดลอง โดยแยก HDL จากซีรัมของกลุ่ม Hypertriglyceridemia และกลุ่มปกติ โดยวัด Lipid peroxide ที่เกิดขึ้น ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 แล้วคำนวณค่า %Inhibition เปรียบเทียบกับค่าที่ได้กับกลุ่มปกติ พบว่าประสิทธิภาพของ HDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีแนวโน้มการยับยั้ง LDL oxidation ต่ำกว่า HDL ที่แยกได้จากกลุ่มปกติ ดังแสดงในรูปที่ 6

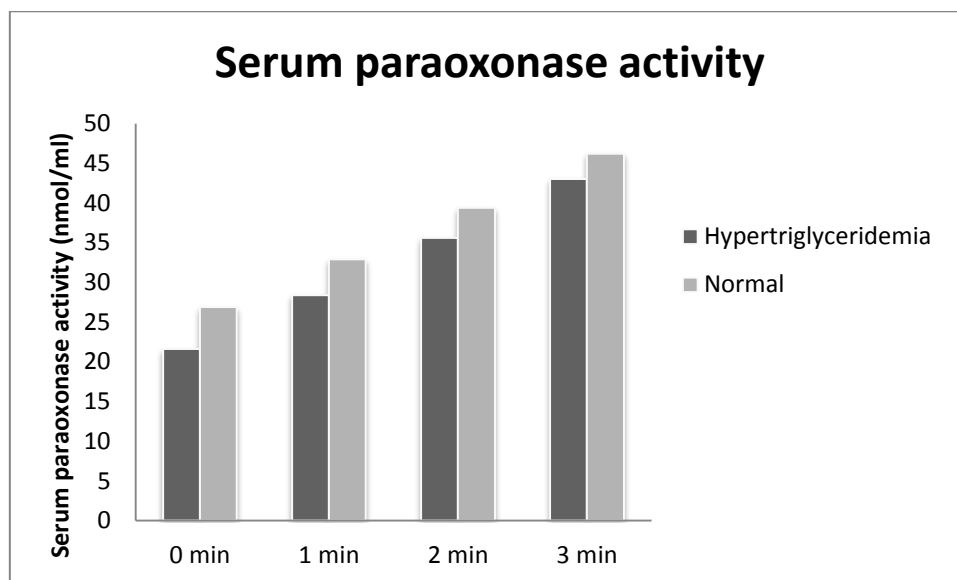


รูปที่ 6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย %Inhibition ของ HDL ต่อการยับยั้ง LDL oxidation ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ

4.4 Serum Paraoxonase activity ของกลุ่มHypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ

จากการศึกษา Paraoxonase activity ในซีรัมของกลุ่ม hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ พบว่า Paraoxonase activity ของกลุ่ม hypertriglyceridemia มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มปกติ ดังแสดงในรูปที่ 7

รูปที่ 7 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย Serum paraoxonase activity จากกลุ่ม hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติในเวลาที่ 0, 1, 2 และ 3



V. Discussion

โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular diseases, CVD) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบัน เป็นสาเหตุนำของการเสียชีวิตในประเทศอเมริกาและประเทศทางตะวันตก⁸ และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของคนไทยสูงเป็นอันดับที่สามในระยะสิบปีที่ผ่านมา⁹ และอาจมีแนวโน้มสูงขึ้นในอนาคต

สถานการณ์และปัจจัยเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด

สถานการณ์ทั่วโลก

องค์การอนามัยโลก รายงานว่าในปี พ.ศ. 2553 โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งจากทั่วโลก พบประมาณ 17.5 ล้านคน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 30 จากการเสียชีวิตทั้งหมด และคาดประมาณว่า ในปี พ.ศ. 2558 การเสียชีวิตจากโรคนี้อาจเพิ่มเป็น 20 ล้านคน

สถานการณ์ในประเทศไทย

ในประเทศไทยพบโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ อุบัติการณ์คนไทยเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด เมื่อเปรียบเทียบกับสาเหตุการเสียชีวิตจากรายงานสถิติสาธารณสุข พบว่าอัตราการเสียชีวิตต่อแสนประชากรด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดจาก 28.4 ใน ปี 2549 เพิ่มขึ้นเป็น 28.9 ในปี 2553 จะเห็นได้ว่าอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคนี้อาจมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากรายงานสถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2537 – 2554 (ตารางที่ 3) แสดงอัตราการตายด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญ ที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศ ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคเบาหวาน¹⁰

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน ด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด (CVD) โรคเบาหวาน (DM) โรคหลอดเลือดในสมอง และโรคมะเร็ง ปี พ.ศ. 2537-2554 (ดัดแปลงจากรายงานสถิติสาธารณสุข สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข)

ปี (พ.ศ.)	อัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน			
	มะเร็ง	หัวใจ (รวมติด หัวใจขาดเลือด และโรคหัวใจอื่นๆ)	โรคหลอดเลือดในสมอง	เบาหวาน
2537	48.9	62.5	10.6	7.2
2538	62.5	69.3	10.9	7.4
2539	48.9	79.6	10.9	9.1
2540	62.5	72.1	10.1	7.5
2541	48.9	63.4	7.0	7.9
2542	62.5	79.9	10.8	11.4
2543	48.9	31.9	13.4	12.2
2544	62.5	30.3	18.2	13.2
2545	48.9	24.4	21.5	11.8
2546	62.5	27.7	29.1	10.6
2547	48.9	26.8	30.8	12.3
2548	62.5	28.2	25.3	11.4
2549	48.9	28.4	20.6	12.0
2550	62.5	29.3	20.6	12.2
2551	48.9	29.8	20.8	12.2
2552	62.5	29.0	21.0	11.1
2553	48.9	28.9	27.5	10.8
2554	62.5	31.4	30.0	11.9

ที่มา <http://bps.ops.moph.go.th/index.php?mod=bps&doc=5>

เนื่องจากโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease; CVD) เป็นโรคเรื้อรังที่มีค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลสูง และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นทุกปีในประเทศไทย¹¹ การป้องกันโรคจึงเป็นหนทางที่ดีที่สุด การป้องกันโรค CVD สามารถทำได้โดย ลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้ ได้แก่ การสูบบุหรี่เป็นประจำ การขาดการออกกำลังกาย การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia) และโรคเบาหวาน ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ คือ ภาวะที่ร่างกายมีระดับ Plasma cholesterol, Plasma triglycerides และ Low-density lipoproteins (LDL) cholesterol สูงเกินค่าปกติ มีระดับ High-density lipoproteins

(HDL) cholesterol ต่ำกว่าค่าปกติ และมีสัดส่วนของ small, dense LDL (sd-LDL) สูง¹ จากการศึกษาอุบัติการณ์ของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด พบว่า ผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิด CVD มากกว่าผู้ที่มีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)¹²

The Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program ได้แบ่งเกณฑ์ของระดับ Plasma triglycerides ดังนี้¹³

- Normal มี Plasma triglycerides < 150 mg/dl
- Borderline high มี Plasma triglycerides 150-200 mg/dl
- High มี Plasma triglycerides 200-500 mg/dl
- Very high มี Plasma triglycerides >500 mg/dl

ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (Hypertriglyceridemia) คือมีระดับ Plasma triglycerides หลังอดอาหารสูงเกิน 200 mg/ml. ระดับของ Plasma triglycerides ที่เหมาะสม คือ ไม่เกิน 150 mg/dl, Plasma triglycerides มาจาก 2 ส่วน ได้แก่ Exogenous และ Endogenous

- Exogenous คือไตรกลีเซอไรด์ที่มาจากอาหารซึ่งขนส่งโดย Chylomicrons ภายหลังกินอาหาร มากกว่าร้อยละ 90 ของ plasma triglycerides
- Endogenous คือไตรกลีเซอไรด์ที่มาจากตับ และขนส่งโดย Very-low density lipoprotein หรือ VLDL

ภายหลังกินอาหาร มากกว่าร้อยละ 90 ของ Plasma triglycerides จะขนส่งโดย Chylomicrons ส่วน Plasma triglycerides ในสภาวะ Fasting stage จะเป็น Triglycerides ที่ขนส่งโดยไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำมาก (Very low-density lipoprotein, VLDL) ในกระแสเลือด Chylomicrons เป็น triglyceride-rich lipoproteins สร้างจากลำไส้เล็กเพื่อขนส่ง triglycerides เอนไซม์ Lipoprotein lipase จะย่อย fatty acids จาก Chylomicrons เพื่อใช้เป็นพลังงาน Chylomicron ที่ถูกดึง fatty acids ออกๆไป เหลือเป็นอนุภาคที่เรียกว่า Chylomicron remnants ซึ่งจะถูกลำเลียงกลับไปตับ และสร้างเป็น Very low-density lipoproteins (VLDL) เข้าสู่กระแสเลือด triglycerides ใน VLDL ถูก lipoprotein lipase ย่อยเพื่อใช้เป็นพลังงาน เหลือเป็น VLDL remnant และถูกลำเลียงกลับไปตับ ระดับ Plasma triglycerides สูงขึ้น เป็นผลเนื่องมาจาก 1) ร่างกายสร้าง triglycerides จากตับและลำไส้เล็กเพิ่มขึ้น¹⁴ 2) Lipoprotein lipase ในพลาสมา มี activity ลดลง⁵

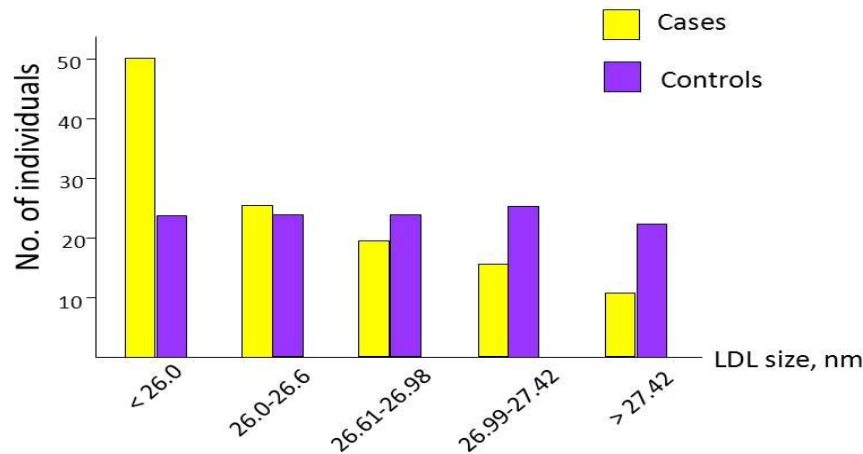
ในผู้ที่มีไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ตับจะสร้าง VLDL มากขึ้น ประกอบกับ lipoprotein lipase ซึ่งทำหน้าที่ย่อย Fatty acids ซึ่งอยู่ในอนุภาคของ VLDL นั้นมี activity ที่ลดลง ทำให้มี VLDL

ตกค้างอยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานาน triglycerides ใน VLDL จะแลกเปลี่ยนกับ cholesteryl ester ที่อยู่ในพาร์ติเคิลของ LDL และ HDL มากขึ้น โดยอาศัยความช่วยเหลือของ Cholesteryl ester transfer protein (CETP) หลังจากแลกเปลี่ยนไขมัน พาร์ติเคิลของ LDL และ HDL กลายเป็น triglyceride-rich LDL และ triglyceride-rich HDL ตามลำดับ หลังจากนั้น hepatic lipase จะย่อย triglycerides ซึ่งเป็น core lipids ของอนุภาค triglyceride-rich LDL ทำให้พาร์ติเคิลเล็กลง เกิดเป็น sd-LDL¹⁵ ส่วน triglyceride-rich HDL จะถูกกำจัดออกจากกระแสเลือด ทำให้ระดับ HDL-cholesterol ในเลือดต่ำลง¹⁶ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า HDL ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีคุณสมบัติเป็น triglyceride-rich HDL ซึ่งดูได้จาก TG/TC ratio ของ HDL ที่ได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีค่าสูงกว่า HDL ของกลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) โดย triglyceride-rich HDL จะถูกกำจัดออกจากกระแสเลือด ทำให้กลุ่ม Hypertriglyceridemia มีระดับ HDL-cholesterol ต่ำกว่ากลุ่มปกติ ซึ่งสอดคล้องกับ Lipoprotein profiles ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia ที่มีระดับ HDL-cholesterol ต่ำกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

ระยะเริ่มต้นของการเกิด CVD เกิดจาก LDL ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่พบมากในกระแสเลือด สามารถแทรกตัวเข้าไปในผนังหลอดเลือดชั้น intima แล้วถูก oxidized โดยอนุมูลอิสระ เกิดเป็น oxidized-LDL¹⁷ ซึ่งมีคุณสมบัติต่างจาก normal LDL, oxidized-LDL ไม่สามารถจับกับ LDL-receptor บนผิวเซลล์ได้ แต่สามารถจับกับ acetyl-LDL receptor หรือ scavenger receptor ซึ่งพบบนผิวของ macrophages¹⁸ การรับ oxidized-LDL เข้าสู่เซลล์ macrophage ไม่มีการอิมตัว macrophages สามารถรับ oxidized-LDL ได้เรื่อย ๆ จึงทำให้ macrophages เต็มไปด้วย cholesterol และมีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่า foam cells คุณสมบัติที่สำคัญของ oxidized-LDL คือ 1) ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิด monocytes ผ่านเข้าสู่ผนังหลอดเลือดได้ง่ายขึ้น และเจริญเป็น macrophages 2) ทำให้ macrophages อยู่ในผนังหลอดเลือดได้นานขึ้น ซึ่งก่อให้เกิด foam cells มากขึ้น¹⁹

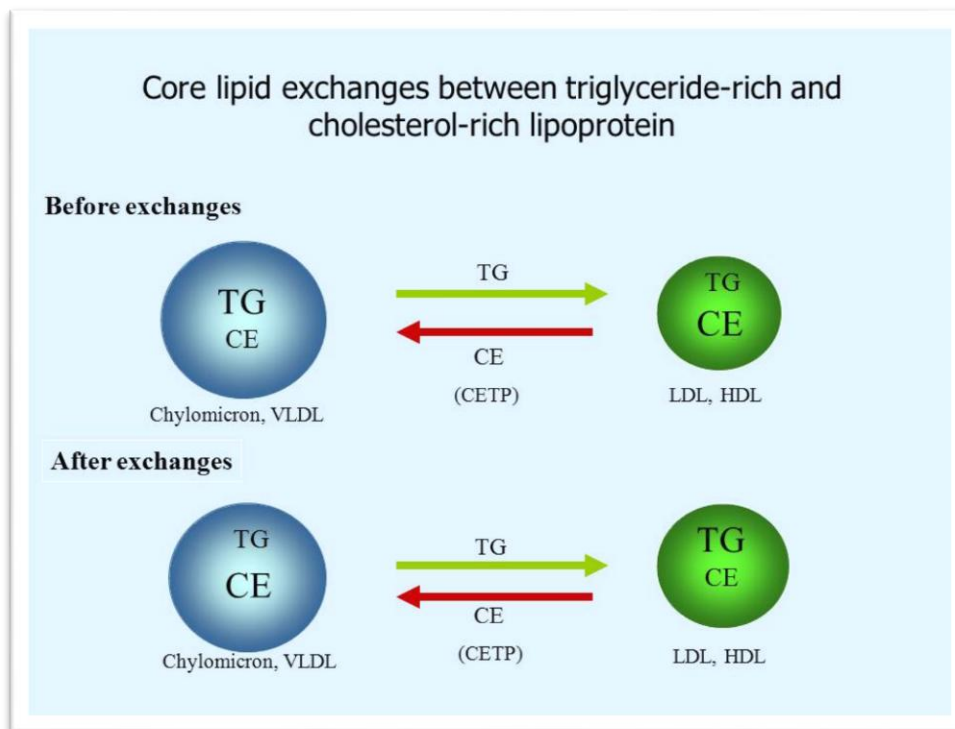
LDL เป็นไลโปโปรตีนที่มี density อยู่ระหว่าง 1.019-1.063 g/ml เนื่องจาก LDL มีความหลากหลายทางขนาด และ density จึงมีผู้ศึกษาความสัมพันธ์ของ LDL ขนาดต่าง ๆ กับการเกิด CVD อาทิเช่น Gardner และคณะ²⁰ ได้ศึกษา LDL particle diameter ของผู้ป่วย CVD และ กลุ่มปกติ พบว่า กลุ่มผู้ป่วย CVD มี LDL ที่มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มปกติ (รูปที่ 8) การศึกษาของ Austin และคณะ²¹ ทำการศึกษา LDL particle diameter ในผู้ป่วย CVD และ กลุ่มปกติ พบว่า ผู้ป่วย CVD จะมี LDL particle diameter ต่ำกว่า 25.5 nm ส่วนกลุ่มปกติมี LDL particle size สูงกว่า 25.5 nm ดังนั้น LDL ที่มีขนาดเล็ก หรือ เรียกว่า small, dense (sd) LDL จึงมีความสัมพันธ์กับการเกิด CVD มากกว่า LDL ที่มีขนาดใหญ่ หรือที่เรียกว่า large, buoyant (lb) LDL

รูปที่ 8 The size distribution of LDL mean particles diameter of cases and controls (Gardner, et. al., 1996)



กลไกการเกิด Small, dense LDL (sd-LDL) เกิดจากการแลกเปลี่ยนไขมันแกนในอนุภาค LDL กับไขมันแกนในอนุภาค VLDL เนื่องจากอนุภาค VLDL เป็น Triglyceride-rich lipoprotein มี triglycerides เป็นส่วนประกอบหลัก ส่วน LDL เป็น Cholesterol-rich lipoprotein มี Cholesterol เป็นส่วนประกอบหลัก เมื่ออยู่ในกระแสเลือดเอนไซม์ Cholesteryl ester transfer protein (CETP) ซึ่งทำหน้าที่ transfer Cholesterol จาก LDL ไปยัง VLDL ในขณะเดียวกัน triglyceride ใน VLDL จะ transfer ไปยัง LDL ทำให้ LDL กลายเป็น Triglyceride-rich lipoprotein LDL อยู่ในกระแสเลือด อนุภาคเหล่านี้ จะมี triglyceride ในสัดส่วนที่มาก และมี cholesterol ในสัดส่วนที่น้อย หลังจากนั้น Triglyceride-rich lipoprotein LDL จะถูก Lipoprotein lipase ย่อย triglycerides ในอนุภาค Triglyceride-rich lipoprotein LDL ได้เป็น fatty acids ส่วนอนุภาคของ LDL ที่เหลือจะเป็น LDL ที่มีสัดส่วนของไขมันน้อยกว่าปกติ จึงทำให้ LDL กลายเป็น LDL ที่มี density สูง (รูปที่ 8) เนื่องจากมีสัดส่วนไขมันน้อย มีสัดส่วนของโปรตีนมาก เรียกอนุภาคเหล่านี้ว่า sd-LDL หากร่างกายมีระดับ Triglycerides สูงขึ้น จะส่งผลให้มีสัดส่วนของ sd-LDL มากขึ้น โอกาสที่ sd-LDL จะแทรกตัวเข้าไปในผนังหลอดเลือดมีมากขึ้น ดังนั้น ผู้ที่มีภาวะ Hypertriglyceridemia สูงจะส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อ CVD มากขึ้น จากผลการศึกษาในครั้งนี้ จะเห็นว่า LDL ของกลุ่ม Hypertriglyceridemia มี TG/TC ratio สูงกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ LDL มีลักษณะเป็น triglyceride-rich LDL

รูปที่ 9 แสดงกลไกการเกิด Small, dense LDL



จากกลไกการเกิด sd-LDL ที่กล่าวมาข้างต้น เห็นได้ว่าปัจจัยที่เสริมให้เกิด sd-LDL มากขึ้น คือ Hypertriglyceridemia ถึงแม้งานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาปริมาณ sd-LDL ในกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง แต่จากผลการศึกษา TG/TC ratio ใน LDL (ตารางที่ 2) พบว่า LDL ที่แยกได้จากอาสาสมัครที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง มี TG/TC ratio สูงกว่ากลุ่มปกติ LDL เหล่านี้ จะถูก Lipoprotein lipase ย่อย triglycerides ซึ่งเป็นไขมันแกนออกไป ทำให้กลายเป็น sd-LDL

ปัจจัยสำคัญเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด คือ เกิดจากสภาวะ oxidative stress โดย LDL สามารถแทรกตัวเข้าสู่ผนังหลอดเลือดแล้วเกิด LDL-oxidation ขึ้น ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของ CVD หาก LDL ในกระแสเลือดมีส่วนของ sd-LDL สูง ยิ่งทำให้ LDL แทรกตัวเข้าสู่ผนังหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น oxidized LDL จะถูกจับกินด้วย macrophage และนำ LDL เข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่จำกัดปริมาณ macrophage ที่กิน oxidized LDL เข้าไปมากทำให้มีโคเลสเตอรอลในเซลล์มาก จึงกลายเป็น foam cell อยู่ที่ผนังเส้นเลือดหลอดเลือด เกิดเป็นคราบ plaque อุดตันทางเดินเลือด ทำให้เกิด atherosclerosis⁶ ดังนั้น การศึกษาความไวต่อการเกิด LDL-oxidation จึงสามารถทำนายความเสี่ยงต่อการเกิด Atherosclerosis ได้ จากการศึกษาความไวต่อการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในหลอดทดลองของผู้ที่มีภาวะ Hypertriglyceridemia เปรียบเทียบกับคนปกติพบว่า พบว่า LDL ที่แยกได้จากผู้ที่มีภาวะ Hypertriglyceridemia จะมีแนวโน้มถูก Oxidized ได้ง่ายกว่า LDL ของกลุ่มปกติ (รูปที่ 5) จากผลการทดลองที่ได้นี้ กล่าวได้ว่าผู้ที่มีภาวะ Hypertriglyceridemia มีความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจมากกว่าคนปกติ อาจเนื่องมาจาก LDL oxidation เกิดได้ง่ายและเร็วกว่าคนปกติ

เป็นที่ทราบกันดีว่า HDL สามารถลดอัตราเสี่ยงของการเกิด CVD ได้ หน้าที่หลักของ HDL คือขนส่ง cholesterol จาก peripheral tissues กลับคืนสู่ตับ หรือเรียกว่า Reverse cholesterol transport โดยอาศัยความช่วยเหลือของ Lecithin:cholesterol acyltransferase; LCAT^{22,23} นอกจากนี้ HDL ยังสามารถป้องกันการเกิด oxidation ของ LDLs ได้^{24,25} เมื่อศึกษาถึงกลไกของ HDL พบว่า มีเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด ที่ทำหน้าที่ เป็น antioxidant เอนไซม์เหล่านี้ ได้แก่ Paraoxonase 1 หรือ PON 1 และ Platelet-activating factor acetylhydrolase เอนไซม์ PON 1 ในพลาสมาส่วนใหญ่จะจับกับโมเลกุลของ HDL โดยมี apolipoprotein ชนิด A-I ช่วยให้จับกับ HDLs ได้ดียิ่งขึ้น²⁶ เนื่องจาก HDL มีขนาดเล็ก จึงสามารถผ่านเข้าออกผนังหลอดเลือดได้ เมื่อ HDL เข้าผนังหลอดเลือด จะพาเอา PON1 เข้าไปด้วย HDL จึงสามารถป้องกันการเกิดกระบวนการ LDL oxidation ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของการเกิด foam cells และนำไปสู่ CVD

เนื่องจาก HDL สามารถลดอัตราเสี่ยงของการเกิด CVD ได้โดยเพิ่มกระบวนการ Reverse cholesterol transport และป้องกันการเกิด LDL oxidation ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด foam cells แต่ในผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์สูง activity ของ PON-1 ในซีรัมจะต่ำกว่าคนปกติ²⁷ ประกอบกับ HDL ในพลาสมา มีจำนวนลดลง²⁸ จึงทำให้อัตราเสี่ยงต่อ CVD สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาวิจัยนี้ จึงศึกษาความสามารถของ HDL แยกได้จากผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงในการต้าน LDL oxidation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับ HDL ที่แยกได้จากคนปกติ

เนื่องจาก HDL มีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โดย HDL มีหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลกลับคืนสู่ตับและต้านการเกิด LDL oxidation ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด foam cells แต่ในผู้ที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์สูง จะมี HDL-C ลดลง ประกอบกับ PON-1 activity ในซีรัมต่ำกว่าคนปกติ²⁹ จึงทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดมากขึ้น จากผลการวิจัยนี้ พบว่าความสามารถของ HDL ในการยับยั้งปฏิกิริยา LDL-oxidation ในหลอดทดลอง โดยวัดเป็น %Inhibition พบว่าความสามารถของ HDL ที่แยกได้จากกลุ่ม Hypertriglyceridemia มีแนวโน้มการยับยั้ง LDL oxidation ต่ำกว่า HDL ที่แยกได้จากกลุ่มปกติ ดังแสดงในรูปที่ 6

จากการศึกษาความสามารถของ HDL ที่แยกจากผู้ที่มีไตรกลีเซอไรด์สูง ต่อการต้าน LDL-oxidation ในหลอดทดลอง พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า HDL ที่แยกได้จากกลุ่มปกติ ถึงแม้ว่าทั้งสองกลุ่มจะมีระดับ HDL-C ไม่ต่างกัน จึงทำให้ผู้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ¹ O'Donnell CJ, Elosua R. Cardiovascular Risk Factors. Insights from Framingham Heart Study. Revista Española de Cardiología (English Edition), Volume 61, Issue 3, 2008, Pages 299-310.
- ² Austin MA. Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. Am J Cardiol. 1999; 83(9B): 13F-16F.
- ³ Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up 8 years. Eur Heart J. 1998;19(suppl A):A2-11.
- ⁴ Hokanson LE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of HDL cholesterol level: a meta analysis of population-based prospective study. J Cardiovasc Risk 1996;3:213-9.
- ⁵ Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. Canadian Medical Association J 2007; 176(8): 1113-1120.
- ⁶ Nouroozadeh J, Tajaddinisarmadi J, Wolff S.P. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. Analytical Biochemistry. 1994; 220: 403-409.
- ⁷ Hasselwander O, McEneny J, McMaster D, Fogarty DG, Nicholls DP, Maxwell AP, Young IS. HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. Atherosclerosis. 1999; 143(1): 125-133.
- ⁸ Blankenberg S, Zeller T, Saarela O, Havulinna AS, Kee F, Kuulasmaa K, et al. Contribution of 30 Biomarkers to 10-Year Cardiovascular Risk Estimation in 2 Population Cohorts. Circulation 2010; 121: 2388-97.
- ⁹ <http://www.ddc.moph.go.th/advice/showimgpic.php?id=382>. Access on 19 February 2013.
- ¹⁰ กระทรวงสาธารณสุข, สำนักโรคไม่ติดต่อ. รายงานประจำปี 2552. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก 2553.
- ¹¹ Ministry of Public Health, Thailand [Online]. Oct 21, 2004. Available from: URL: http://epid.moph.go.th/NCDweb2/Dr_lee/File_1.html. Accessed in June 2007.
- ¹² Austin MA. Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. Am J Cardiol. 1999; 83(9B): 13F-16F.
- ¹³ National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment

- Panel III). The third Report of the National Cholesterol Education Program (NCAP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 2002; 106:3143-21.
- ¹⁴ Brites FD, Bonavita CD, Cloes M, Yael MJ, Fruchart JC, Castro GR, et.al. VLDL compositional changes and plasma levels of triglycerides and high density lipoprotein. Clin Chim Acta 1998; 269(2): 107-24.
- ¹⁵ Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Butbul E, Sharon I, Olivecrona T. Reversible modification of human plasma low density lipoproteins toward triglyceride-rich precursors. A mechanism for losing excess cholesterol esters. J. Biol. Chem.1982; 257:6509-17.
- ¹⁶ Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. Am J Cardiol 1998; 81:13B-17B.
- ¹⁷ Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. Am J Med. 1993; 94(4): 350-6.
- ¹⁸ Dhaliwal BS and Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. Clin Chim Acta 1999; 286(1-2): 191-205.
- ¹⁹ Jialal I and Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. Clin. Chem. 1996; 42: 498 - 506.
- ²⁰ Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. JAMA 1996; 276(11):875-81.
- ²¹ Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertiglyceridemia as a cardiovascular risk factor. Am J Cardiol 1998; 81: 7B-12B.
- ²² Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21: 13 - 27.
- ²³ Gotto Am, Jr. Low High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Risk Factor in Coronary Heart Disease : A Working Group Report. Circulation 2001; 103: 2213 - 2218.
- ²⁴ Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21: 473 - 480.

-
- ²⁵ Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. Biochim Biophys Acta 1990; 1044(2): 275-83.
- ²⁶ Libby P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. Am J Cardiol. 2001; 88(12A): 3N-8N.
- ²⁷ Brites FD, Verona J, Schreier LE, Fruchart JC, Castro GR, Wikinski RL. Paraoxonase 1 and platelet-activating factor acetylhydrolase activities in patients with low HDL-cholesterol levels with or without primary hypertriglyceridemia. Arch Med Res. 2004; 35(3): 235-40.
- ²⁸ Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. Clin Chim Acta 1999; 286(1-2): 145-61.
- ²⁹ Brites FD, Verona J, Schreier LE, Fruchart JC, Castro GR, Wikinski RL. Paraoxonase 1 and platelet-activating factor acetylhydrolase activities in patients with low HDL-cholesterol levels with or without primary hypertriglyceridemia. Arch Med Res. 2004; 35(3): 235-40.