



วิทยานิพนธ์

การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยคนไทยที่มี
ภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฐมภูมิ

Identification of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Gene
Mutation in Thai Patients with Familial Hypercholesterolemia (FH)

นายรัชชต์ สว่างพาณิชย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุวิศวกรรม

สาขา

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

ภาควิชา

เรื่อง การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยคนไทยที่มี
ภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปรัมภูมิ

Identification of Low Density Lipoprotein Receptor (*LDLR*) Gene Mutation
in Thai Patients with Familial Hypercholesterolemia (FH)

นามผู้วิจัย นายรัชชต์ สว่างพาณิชย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์อรรณชัย สุระ, พ.บ.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พรพวงษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉริยะกุล, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยคนไทยที่มี
ภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฐมภูมิ

Identification of Low Density Lipoprotein Receptor (*LDLR*) Gene Mutation in Thai Patients with
Familial Hypercholesterolemia (FH)

โดย

นายรัชชต์ สว่างพาณิชย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)
พ.ศ. 2550

รัชชดล สว่างพาณิชย์ 2550: การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วย
คนไทยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฏุมภูมิ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ธัญชัย สุระ, พ.บ. 94 หน้า

สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันเกิดจากการที่มีสภาวะโคเลสเตอรอล
ในเลือดสูงโดยเฉพาะภาวะโคเลสเตอรอลสูงในเลือดแบบปฏุมภูมิ สาเหตุหนึ่งของการเพิ่มขึ้นของ
แอลดีแอลเกิดจากความผิดปกติของยีนตัวรับแอลดีแอล (low density lipoprotein receptor, *LDLR*)
ซึ่งทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่เรียกว่า familial hypercholesterolemia (FH) ความผิดปกตินี้มีผล
ทำให้การสลายของแอลดีแอลในกระแสเลือดลดลง และเมื่อเกาะเลือดคนไข้ตั้งทิ้งไว้จะไม่พบ
การขุ่นในชั้นพลาสมา แอลดีแอลที่ค้างอยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานานอาจถูก oxidized และ ตัวรับ
แอลดีแอลไม่สามารถรับเข้าสู่เซลล์มีผลทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดซึ่งเป็นอาการที่นำไปสู่
โรคหัวใจ (cardiovascular disease, CAD) ในที่สุด ได้มีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนตัวรับ
แอลดีแอลพบว่าการกลายพันธุ์กว่า 700 ตำแหน่ง การศึกษาในครั้งนี้ได้ตรวจค้นการกลายพันธุ์
ของยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยคนไทยที่มีสภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงแบบปฏุมภูมิ
โดยศึกษา *LDLR* ด้วยการตรวจด้วยวิธี SSCP (n=19) ปรากฏว่าพบ SSCP pattern ที่แตกต่างไป
15 รายใน exon 10 , 6 รายใน exon 11 , 11 รายใน exon 12 และ อีก 2 รายใน exon 15 จากนั้นได้
ทำการศึกษาลำดับเบสบนดีเอ็นเอใน SSCP pattern ที่แตกต่างไปด้วยวิธี automated DNA
sequencing พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสใน exon 10 ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 24134 (A>G)
exon 11 ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 26669 (C>T) exon 12 ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 27471 (C>T) และ
exon 15 ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 33810 (A>G) การเปลี่ยนแปลงของเบสทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำ
ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนและได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้วซึ่งต้อง
ทำการศึกษาต่อไป

Ruchchadol Sawangpanich 2007: Identification of Low Density Lipoprotein Receptor (*LDLR*) Gene Mutation in Thai Patients with Familial Hypercholesterolemia (FH). Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associated Professor Thanyachi Suru, M.D. 94 pages.

Hypercholesterolemia is one of the major risk factors for Coronary Artery Disease (CAD). Both hereditary and environmental factors lead to a wide variation in concentrations of low density lipoprotein cholesterol (LDL) in the general population. One form of primary in the *LDLR* gene causes an inherited primary hypercholesterolemia namely familial hypercholesterolemia (FH). Such mutation result in impaired clearance of plasma LDL and accumulation of LDL in bloodstream for a long time. At present, more than 700 mutations have been identified worldwide. In the present study, mutations at *LDLR* gene in Thai subjects with primary hypercholesterolemia were screened by PCR-SSCP. Different SSCP patterns in DNA samples from patients (n=19) were found as follows, fifteen in exon 10, six in exon 11 , eleven in exon 12 and another two in exon 15. Different SSCP patterns in exon 10, exon 11, exon 12 and exon 15 were characterized by automated DNA sequencing. Transition from A to G at nucleotide 24134, C to T at nucleotide 26669, C to T at nucleotide 27471 and A to G at nucleotide 33810 were found in exon 10, 11, 12 and 15 respectively. Single base change in each exon did not cause amino acid change and these changes have been reported previously.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รัชชัย สุระ ธารณกรรมการ
ที่ปรึกษาที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งให้คำปรึกษา และ
แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ พราพษ์ กรรมการ
ที่ปรึกษาวิชาเอก อาจารย์ ดร.วิภา หงษ์ตระกูล กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และ อาจารย์ ดร.สุพร
ลีจิระจำเนียร อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำ
วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ
ประธานสาขาพันธุ์วิศวกรรมที่คอยให้คำแนะนำที่ดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณมานิสา นุชบารัตน์ คุณสุภัค ยังเจริญ และคุณสาริณี ปิงสุทธีวงศ์
นักวิทยาศาสตร์ หน่วยเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติที่ช่วยให้
คำปรึกษา และแนะแนวทางต่าง ๆ ในการปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่หน่วยเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชา
อายุรศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติทุกคน ที่อำนวยความสะดวกทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดามารดาของข้าพเจ้า และขอขอบคุณ ญาติสนิท มิตรสหาย เพื่อน ๆ
ที่ทำงาน และพี่น้องชาวพันธุ์วิศวกรรมทุกท่านที่เป็นกำลังใจให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

รัชชต์ล สว่างพานิชย์

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	49
อุปกรณ์	49
วิธีการ	53
ผลและวิจารณ์	64
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ภาคผนวก	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระดับความเสี่ยง 3 ระดับที่กำหนดแอลดีแอลเป้าหมายในการรักษา	10
2	ระดับไขมันที่ปกติหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน	20
3	ลักษณะเฉพาะและส่วนประกอบของไลโปโปรตีนชนิดต่าง ๆ	23
4	ระดับแอลดีแอลที่ควรพิจารณาให้ยาในผู้ป่วยที่มีระดับความเสี่ยงระดับต่าง ๆ	37
5	ไพรมอร์ซึ่งจำเพาะเจาะจงต่อยีนตัวรับแอลดีแอลที่ใช้ในการทดลอง	52
6	การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 6% (19 : 1)	61
7	สรุปการเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่งของผู้ป่วยทั้ง 19 ราย	78
8	สรุปผลของการเปลี่ยนแปลงเบสในแต่ละ exon	78
9	Haplotype ของการเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่ง	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภูมิความสอดคล้องของแนวโน้มการตายและพัฒนาเศรษฐกิจและสังคม	4
2	แผนภูมิแสดงแนวโน้มอัตราการตายของโรคหัวใจและหลอดเลือดที่เป็นปัญหาสาธารณสุขและเบาหวาน	5
3	Cholesterol producers	6
4	เอชดีแอลและแอลดีแอล	7
5	Blood test	14
6	Atherosclerosis	15
7	(ก) Carotid stenosis, X-ray of the right artery	17
	(ข) Developmental process of atherosclerosis	17
8	แอลดีแอลคอเลสเตอรอลและอะโพโปรตีน บี100	25
9	กระบวนการการทำลายแอลดีแอลภายในเซลล์	26
10	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ของกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดในไทย	28
11	การจับกันของแอลดีแอลที่ติดสารกัมมันตภาพรังสีกับตัวรับที่ปกติบนผิวเซลล์ และตัวรับที่ผิดปกติบนผิวเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ	29
12	แสดงโครงสร้างของยีนตัวรับแอลดีแอลและหน้าที่ของแต่ละส่วน	30
13	การจำแนกการกลายพันธุ์บนยีนตัวรับแอลดีแอล	31
14	ลักษณะอาการ xanthoma	33
15	ปิรามิดอาหาร	36
16	Prevention of heart disease	39
17	การตรวจโพลีเมอร์พีซีเอ็มจากผลผลิตของพีซีอาร์ด้วยวิธี SSCP	46
18	การให้คำปรึกษาเกี่ยวกับโอกาสของการเกิดโรค Familial Hypercholesterolemia ในรุ่นถัดไป	
	(ก) โอกาสของการเกิดโรค FH ในรุ่นถัดไปในกรณีที่พ่อหรือ แม่เป็น เฮเทอโรไซกัส	
	(ข) โอกาสของการเกิดโรค FH ในรุ่นถัดไปในกรณีที่พ่อและ แม่เป็น เฮเทอโรไซกัส	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
19	ชิ้นส่วนของ promoter และ exon ต่าง ๆ ของยีนตัวรับแอลดีแอลที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์
20	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากรอบปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม 1
21	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากรอบปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม 2
22	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากรอบปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม 3 และ 4
23	SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 10 15 ราย
24	SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 11 6 ราย
25	SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 12 11 ราย
26	SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 15 2 ราย
27	เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 10 (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 5, 10, 16, 19 (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 2, 6, 9, 11, 12, 17 (AA→AG) (ค) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 1, 3, 4, 7, 8, 13, 14, 15, 18 (AA→GG)
28	เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 11 (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 3, 4, 6, 7, 15, 19 (CC→CT)
29	เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 12 (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 3, 4, 5, 6, 10, 16, 17, 19 (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 8, 9, 11, 12, 14, 18 (CC→CT) (ค) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 7, 13, 15 (CC→TT)

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 15 (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 8, 9, 11, 12, 14, 18 (GG→GA)	77
31	ความหลากหลายของการกลายพันธุ์ในยีน <i>PCSK9</i> ที่เกี่ยวข้องกับ ระดับของแอลดีแอล	80
32	ความหลากหลายของการกลายพันธุ์ในยีน <i>LDLRAP1</i> ที่เกี่ยวข้องกับ การนำแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการเอ็นโดไซโทซิส	80

การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยคนไทยที่มี ภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฏุมภูมิ

Identification of Low Density Lipoprotein Receptor (*LDLR*) Gene Mutation in Thai Patients with Familial Hypercholesterolemia (FH)

คำนำ

ภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฏุมภูมิ (familial hypercholesterolemia, FH) เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบลักษณะเด่น (autosomal dominant, AD) สาเหตุเกิดจากความผิดปกติของตัวรับแอลดีแอล (low density lipoprotein receptor, LDL receptor) ซึ่งเกิดเนื่องจากการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอล (low density lipoprotein receptor, *LDLR*) ทำให้ไม่สามารถสร้างตัวรับแอลดีแอลบนผิวเซลล์ได้หรือได้น้อยหรือได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถรับแอลดีแอลหรือรับแอลดีแอลจากเลือดได้น้อย จึงทำให้แอลดีแอลในเลือดสูง (ค่าแอลดีแอลปกติคือน้อยกว่า 130 mg/dl) โดยพบคลอเลสเทอรอล 300-600 mg/dl ในผู้ที่มีความผิดปกติแบบเฮเทอโรไซกัสพบว่ามีอุบัติการณ์ 1 ต่อ 500 คน มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจสูงเมื่ออายุ 30-40 ปี และ 600-1,000 mg/dl ในผู้ที่มีความผิดปกติแบบโฮโมไซกัส (homozygous) พบว่ามีอุบัติการณ์ 1 ต่อ 1,000,000 คน ซึ่งผู้ที่มีความผิดปกติบนยีนนี้อาจจะมีลักษณะ xanthoma ที่เป็นก้อนไขมันที่ผิวหนังและ atheroma ซึ่งเป็นก้อนไขมันที่เส้นเลือด และอาจจะเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้เมื่ออายุน้อยกว่า 20 ปี โดยที่ผู้ป่วยที่เป็น heterozygote จะมีอาการน้อยกว่า homozygote (ลัดดา, 2547 ; Gelehrter and Collins, 1990 ; Thompson et al., 1991) ปัจจุบันพบว่าการกลายพันธุ์ของยีนตัวรับแอลดีแอลพบกระจายได้ทั่วทั้งยีน โดยสามารถแบ่งการกลายพันธุ์ของยีนตัวรับแอลดีแอลออกได้เป็น 5 ประเภท (class) ดังต่อไปนี้

ประเภทที่ 1 ซึ่งพบได้มากที่สุด ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ตัวรับแอลดีแอลเลย

ประเภทที่ 2 ยังสร้างตัวรับแอลดีแอลได้ แต่ขั้นตอนแต่ง (process) ตัวรับแอลดีแอลใน golgi apparatus ผิดปกติ ทำให้ตัวรับแอลดีแอลไม่ถูกส่งไปที่ผิวเซลล์ (plasma membrane)

ประเภทที่ 3 สามารถสร้างตัวรับแอลดีแอลไปยังผิวเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถจับกับแอลดีแอลภายนอกเซลล์ได้

ประเภทที่ 4 สร้างตัวรับแอลดีแอลที่สามารถจับแอลดีแอลได้ แต่ไม่มีการรวมกลุ่มเป็นโค้ทพิต (coated pit) จึงไม่สามารถเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) นำแอลดีแอลเข้าเซลล์

ประเภทที่ 5 สามารถจับแอลดีแอลรวมกลุ่มเป็นโค้ทพิตเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิสได้ แต่ไม่สามารถนำตัวรับแอลดีแอลกลับมาใช้ที่ผิวเซลล์ใหม่ได้ (Goldstein *et al.*, 2001)

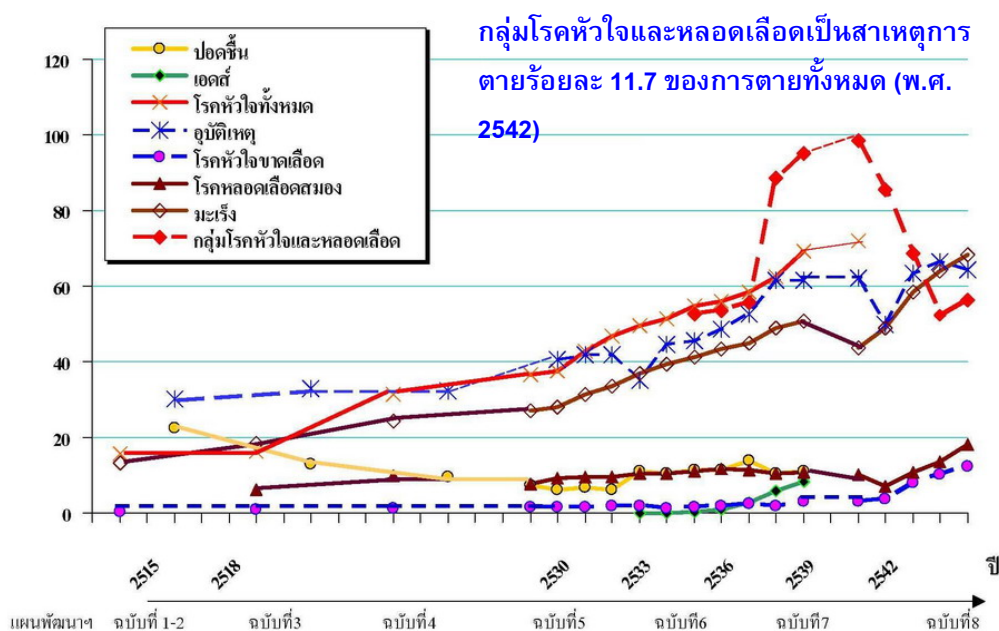
การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยคนไทย ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฏิกมภูมิในผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยคนไทย

วัตถุประสงค์

ตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฏิกิริยาผู้ป่วยคนไทย เพื่อช่วยประกอบการวินิจฉัยของแพทย์เพื่อให้คำแนะนำคนไข้ และสมาชิกในครอบครัวเพื่อลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบก่อนที่จะแสดงอาการ

การตรวจเอกสาร

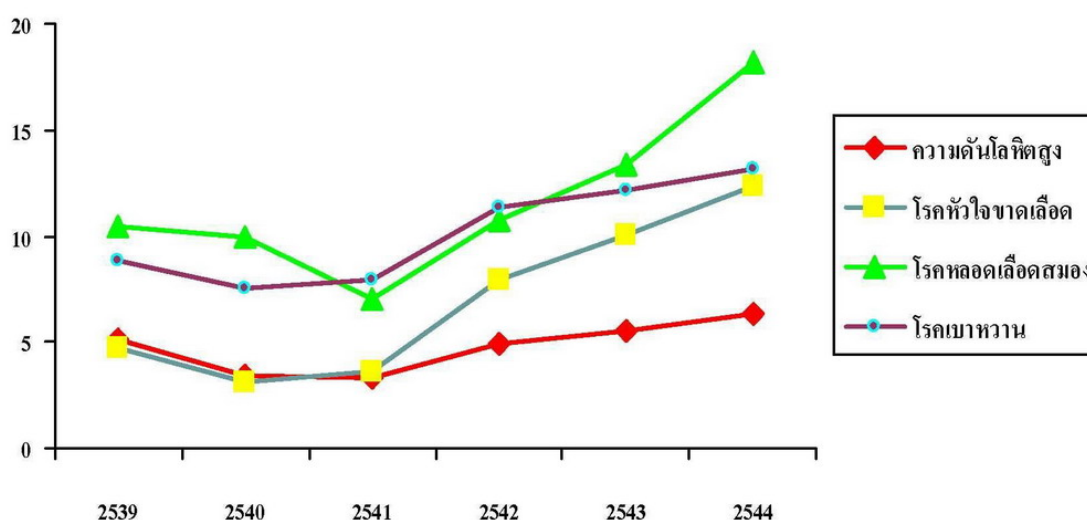
ปัจจุบันโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นปัญหาสำคัญ เพราะเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของประเทศไทยนอกจากโรคมะเร็ง และอุบัติเหตุ คือ ประมาณ 4 คนต่อชั่วโมง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี การศึกษาทางระบาดวิทยาทำให้ทราบว่า การเกิดผนังหลอดเลือดหัวใจอุดตันหรือตีบแคบลง มีสาเหตุมาจากปัจจัยเสี่ยงหลายอย่างประกอบกัน ได้แก่ ภาวะความดันโลหิตสูง เบาหวาน ไขมันในเลือดสูง การสูบบุหรี่ มีประวัติครอบครัวเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ความอ้วน และการไม่ออกกำลังกาย ดังภาพที่ 1 (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทรารักษ์, 2549)



ภาพที่ 1 แผนภูมิความสอดคล้องของแนวโน้มการตายและพัฒนาเศรษฐกิจและสังคม
ที่มา: ฉายศรี (2546)

ภาวะไขมันในเลือดสูง

ภาวะไขมันในเลือดสูง คือภาวะที่ร่างกายมีระดับไขมันในเลือดสูงกว่าเกณฑ์ที่เหมาะสม เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคหัวใจ ซึ่งปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคหัวใจมี 3 อย่าง ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง การสูบบุหรี่ (ยังมีปัจจัยรองอีกหลายประการ) ภาวะไขมันในเลือดสูงทำให้เส้นเลือดไปเลี้ยงหัวใจตีบขาดเลือดไปเลี้ยงและทำให้เกิดกล้ามเนื้อตายได้ ซึ่งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญ ทำให้หลอดเลือดในสมองตีบและสมองฝ่อ ดังภาพที่ 2 (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงแนวโน้มอัตราการตายของโรคหัวใจและหลอดเลือดที่เป็นปัญหา

สาธารณสุขและเบาหวาน

ที่มา: นาสรี (2546)

สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง

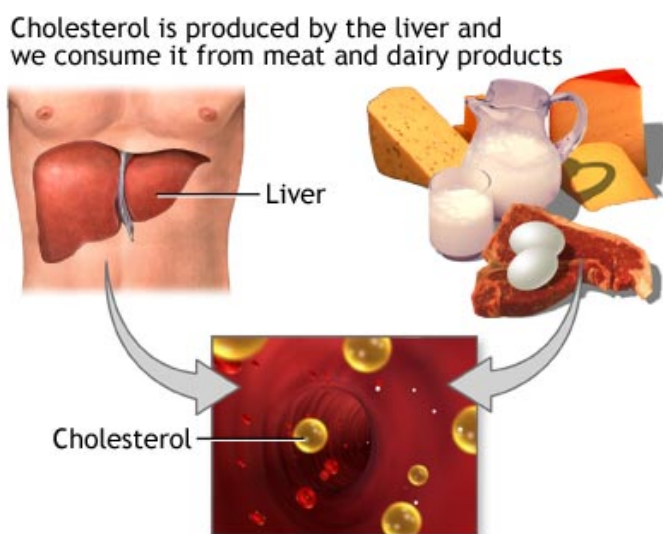
1. การรับประทานอาหารไม่ถูกส่วน คือการรับประทานอาหารที่มีไขมันมากเช่น อาหารทอด ผัดที่ใช้น้ำมันมาก อาหารที่มีส่วนผสมของกะทิและการรับประทานขนมหรือของหวานที่มีน้ำตาลทรายเป็นส่วนผสมทั้งขนมไทยและขนมพวกเบเกอรี่ต่าง ๆ

2. เกิดจากโรคและภาวะบางอย่าง ที่ทำให้เกิดความผิดปกติของระดับไขมันในร่างกาย ได้แก่ โรคไต การรับประทานยาคุมกำเนิด การดื่มสุราเป็นประจำและขาดการออกกำลังกาย

3. ความผิดปกติทางกรรมพันธุ์เช่น บิดา มารดา มีภาวะไขมันในเลือดสูง ชนิดของไขมันในเลือดมีหลายชนิด ไขมันที่ถูกกล่าวถึงเสมอ ๆ คือ คอเลสเตอรอล ซึ่งคอเลสเตอรอลยังแบ่งย่อยออกได้อีก โดยไขมันย่อยมีความสำคัญเกี่ยวกับการเกิดโรคหัวใจมี 2 ตัวคือแอลดีแอล และเอชดีแอล และไขมันที่สำคัญอีกตัว คือ ไตรกรีเซอไรด์ (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)

คอเลสเตอรอล

เป็นสารอาหารประเภทไขมันมาจาก 2 ทางคือ ร้อยละ 80 เกิดจากร่างกายผลิตขึ้นได้เองที่ตับ และร้อยละ 20 มาจากอาหารที่รับประทานเข้าไป โดยจะมีในอาหารประเภทเนื้อสัตว์เท่านั้น เนื้อสัตว์แต่ละชนิดจะมีคอเลสเตอรอลมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร ดังภาพที่ 3 ตัวอย่างอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงได้แก่ ไข่แดง เครื่องในสัตว์ต่าง ๆ กุ้ง ปู หอย ปลาหมึก อาหารบางอย่างไม่มีคอเลสเตอรอลแต่มีไขมันอิ่มสูง เช่น กะทิ เมื่อรับประทานเข้าไปจะมีผลทำให้คอเลสเตอรอลสูงได้ค่าปกติของคอเลสเตอรอลไม่เกิน 200 mg/dl (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)



ภาพที่ 3 Cholesterol producers

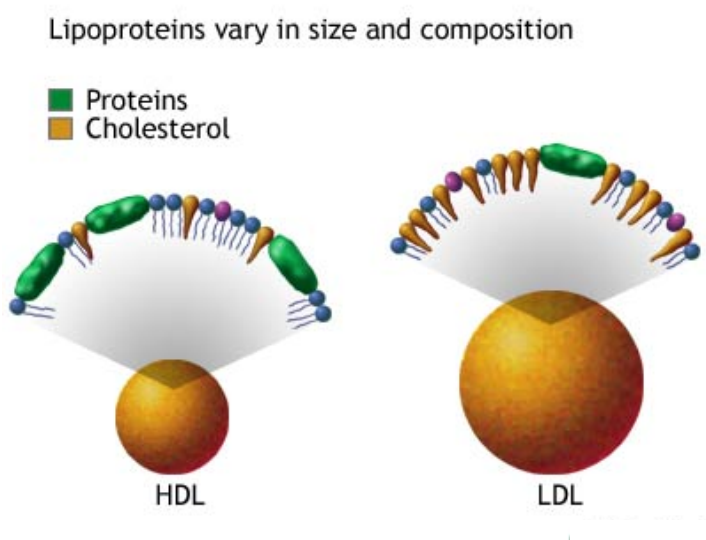
ที่มา: Lindberg (2007)

แอลดีแอลคอเลสเตอรอล

เป็นไขมันที่มาจากกรดไขมันอิ่มตัว (จากน้ำมันสัตว์ เช่น หมู ไก่ จากพืชเช่นน้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม) ซึ่งเป็นไขมันไม่ดีถ้ามีอยู่มากจะเข้าไปเกาะรวมตัวกันได้เยื่อหลอดเลือดแล้วผนังหลอดเลือดให้โป่งเข้าไปในหลอดเลือด ทำให้เลือดเดินไม่สะดวก ถ้าไขมันเหล่านี้ไปรวมตัวกันมาก ๆ จะทำให้เกิดหลอดเลือดตีบมีผลให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย และผู้ป่วยอาจถึงแก่ความตาย กระทั่งหัน หรือถ้าเส้นเลือดที่สมองตีบตันจะทำให้เป็นอัมพาตได้ ค่าที่เหมาะสมของแอลดีแอลในเลือดของแต่ละคน ควรอยู่ระหว่าง 100-160 mg/dl ทั้งนี้ขึ้นกับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทรภรณ์, 2549)

เฮชดีแอลคอเลสเตอรอล

เป็นไขมันชนิดดีที่ร่างกายสร้างขึ้นมาจากการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอโดยเฮชดีแอลจะไปขัดขวางการสะสมของแอลดีแอลที่ผนังหลอดเลือด จึงเป็นตัวขัดขวางการหนาตัวของผนังหลอดเลือด และลดภาวะเสี่ยงต่อโรคหัวใจขาดเลือด ค่าปกติของเฮชดีแอลควรมีมากกว่า 40 mg/dl (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทรภรณ์, 2549)



ภาพที่ 4 เฮชดีแอลและแอลดีแอล

ที่มา: Lindberg (2007)

ไตรกรีเซอไรด์

เป็นไขมันอีกชนิดหนึ่งในเลือดมักจะสูงในคนอ้วนหรือผู้ที่รับประทานของหวานและไขมันอิ่มตัวมาก ๆ ผู้ดื่มสุรา รวมทั้งผู้ป่วยเบาหวานที่คุมน้ำตาลไม่ดีภาวะไตรกรีเซอไรด์ในเลือดสูงจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปัญหาหลอดเลือดตีบ (แอลดีแอลสูงจะสัมพันธ์โดยตรงกับโรคเส้นเลือดหัวใจตีบ) ค่าปกติของไตรกรีเซอไรด์คือไม่เกิน 150 mg/dl (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทรภรณ์, 2549)

ไขมันทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ

เมื่อมีระดับแอลดีแอลในเลือดสูงแอลดีแอลเหล่านี้จะซึมผ่านเซลล์ชั้นบาง ๆ ที่บุอยู่ภายในของผนังหลอดเลือดแดงที่เรียกว่า endothelium เข้าไปอยู่ภายใน โดยจะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนย้ายตัวเองตามมากิน เม็ดเลือดขาวเหล่านี้เมื่อกินแอลดีแอลเข้าไปก็จะเปลี่ยนแปลงตัวเองเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มีคลอเลสเตอรอลสูง เรียกว่า foam cell การที่ยังมีระดับแอลดีแอลในเลือดสูง การซึมผ่านของคลอเลสเตอรอลเข้ามาอยู่ได้ชั้นผนังหลอดเลือดแดง ก็จะมีปริมาณมากขึ้น ทำให้เกิด foam cell ขึ้นจำนวนมากมาย foam cell เหล่านี้เมื่อกินคลอเลสเตอรอลเข้าไปในตัวมากก็จะแตกตัวปล่อยสารพิษต่อผนังหลอดเลือดออกมา ทำให้เกิดการอักเสบ เมื่อนานขึ้นผนังหลอดเลือดก็จะมีคราบไขมัน ทำให้ตีบแคบลง และหากมีจำนวน foam cell อยู่ภายในเป็นปริมาณมากจะทำให้ผนังหลอดเลือดปริแตกได้ง่าย จากนั้นเกล็ดเลือดซึ่งอยู่ภายในกระแสเลือดจะมาเกาะรวมตัวกันบริเวณผนังหลอดเลือดที่ปริแตก จนเกิดลิ่มเลือดขึ้น ซึ่งลิ่มเลือดนี้เองจะไปอุดตันหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน ซึ่งนำไปสู่การเดินผิดจังหวะของหัวใจ ที่เป็นอันตรายทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตกะทันหันได้ (Committee on Diet and Health, 1989)

ไขมันในเลือดสูงเกินปกติจะทำให้เกิดโทษดังนี้

1. ทำให้หลอดเลือดแดงแข็งตัวมีผลให้หัวใจขาดเลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจตายจะมีอาการเจ็บแน่นหน้าอก ถ้ามีผลกับเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงสมองจะทำให้เนื้อสมองขาดเลือดที่ไปเลี้ยงเป็นกับเนื้อสมองส่วนใด ก็ทำให้หน้าที่ของสมองส่วนนั้นเสียไป อาจจะมีอาการชาความจำเสื่อมหรือเป็นอัมพาตได้

2. ตับ ม้าม โต สาเหตุจาก ไตรกรีเซอไรด์ไปคั่งอยู่ในตับ ม้าม

3. มีผลกับระบบประสาททำให้ระบบประสาททำงานผิดปกติ เนื่องจากมีไตรกรีเซอไรด์ไปแทรกตามเนื้อเยื่อของระบบประสาทและจะหายได้ถ้าค่าของไตรกรีเซอไรด์ลดลง

4. ปวดท้องเพราะมีการอุดตันของเส้นเลือดฝอยที่ไปเลี้ยงลำไส้ หรือตับทำให้อวัยวะดังกล่าวขาดเลือด ไปเลี้ยง จะหายได้ถ้าไตรกรีเซอไรด์ลดลง

5. ทำให้อ้วน มีผลให้ปวดข้อทำให้ข้อตึงเหยียดลำบาก (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)

การประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงหัวใจตีบ

ในการประเมินความเสี่ยงที่จะเกิดโรคนั้นนอกจากจะดูที่ระดับของแอลดีแอลแล้วยังต้องดูหัวข้ออื่นประกอบอีก 3 หัวข้อคือ

1. ผู้ป่วยมีโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารี (coronary heart disease, CHD) อยู่แล้วหรือไม่
2. ผู้ป่วยมีโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerotic disease) ในรูปแบบอื่นอยู่หรือไม่ (peripheral arterial disease, abdominal aortic aneurysm, carotid artery disease ที่มีอาการ)
3. ผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ นอกจากการเพิ่มระดับแอลดีแอลอยู่หรือไม่ ปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ นอกจากระดับแอลดีแอลที่ต้องนำมาพิจารณาระดับแอลดีแอลเป้าหมายในการรักษาคือ

3.1 การสูบบุหรี่

3.2 โรคความดันเลือดสูง (ความดันตั้งแต่ 140/90 มม.ปรอทขึ้นไปหรือได้รับยาลดความดันเลือดอยู่แล้ว)

3.3 เชนดีแอลต่ำกว่า 40 mg/dl

3.4 ประวัติโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีในญาติสายตรงเพศชายที่อายุน้อยกว่า 55 ปี หรือเพศหญิงที่อายุน้อยกว่า 65 ปี

3.5 อายุ (เพศชายอายุตั้งแต่ 45 ปี ขึ้นไป เพศหญิงอายุตั้งแต่ 55 ปีขึ้นไป)

โดยที่เบาหวานไม่ได้นำมาแสดงไว้เนื่องจากถือว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญมีน้ำหนักมากกว่า ถ้ามีโรคเบาหวานถือว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดปัญหาทางหลอดเลือดหัวใจในอนาคต เท่ากับผู้ที่ มีโรคหลอดเลือดหัวใจอยู่แล้วเรียกว่า CHD risk equivalent และ ถ้าหากเอชดีแอลสูงตั้งแต่ 60 mg/dl ขึ้นไปถือว่าเป็น “negative” risk factor ให้นำมาหักลบ risk factor ข้ออื่นออกได้ 1 ข้อ เช่น ถ้านับได้ 3 ข้อ ก็จะลบออกเหลือเพียง 2 ข้อ (อภิชาติ และคณะ, 2546)

คนที่ป่วยด้วยโรคหลอดเลือดสมองตีบ หลอดเลือดแดงที่ขาตีบหรือโรคเบาหวาน ถือว่า เป็นผู้ที่มีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคหลอดเลือดแดงหัวใจตีบหมายความว่าร้อยละ 20 ของผู้ป่วย กลุ่มนี้จะเป็นโรคหลอดเลือดแดงหัวใจตีบภายใน 10 ปีข้างหน้า คนที่มีปัจจัยเสี่ยงข้างต้นตั้งแต่ 2 ข้อ ขึ้นไป ถือว่ามีความเสี่ยงปานกลางต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงหัวใจตีบ หมายความว่า ร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้จะเป็นโรคหลอดเลือดแดงหัวใจตีบภายใน 10 ปีข้างหน้า คนที่มี ปัจจัยเสี่ยงข้างต้นไม่เกิน 1 ข้อถือว่ามีความเสี่ยงต่ำต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงหัวใจตีบ (วีรพันธุ์ , 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)

เมื่อพิจารณาทั้ง 3 หัวข้อแล้วจะจัดแบ่งผู้ป่วยตามความเสี่ยงออกเป็น 3 ระดับ ซึ่งในแต่ละ ระดับจะมีแอลดีแอลเป้าหมายที่ต้องการรักษาต่างกันไป ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับความเสี่ยง 3 ระดับที่กำหนดแอลดีแอลเป้าหมายในการรักษา

ระดับความเสี่ยง	ระดับแอลดีแอลเป้าหมาย	
CHD และ CHD risk equivalent	น้อยกว่า	100 mg/dl
risk factor ตั้งแต่ 2 ข้อขึ้นไป	น้อยกว่า	130 mg/dl
risk factor ไม่เกิน 1 ข้อ	น้อยกว่า	160 mg/dl

ที่มา: อภิชาติ และคณะ (2546)

ผู้ที่ระดับความเสี่ยงสูงสุดคือผู้ที่มีโรค CHD และ CHD risk equivalents ซึ่งประการหลังนี้นับรวมผู้ป่วยดังต่อไปนี้ (ข้อใดข้อหนึ่ง)

1. มีโรคหลอดเลือดแข็งในรูปแบบอื่นอยู่แล้ว
2. มีโรคเบาหวาน
3. มีปัจจัยเสี่ยงที่นำมาคำนวณแล้วมีความเสี่ยงในการเกิด CHD ใน 10 ปีข้างหน้าเกินกว่าร้อยละ 20

ทั้งสามหัวข้อนี้จัดว่ามีความเสี่ยงในการเกิด major coronary events เทียบเท่ากับผู้ที่ เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีอยู่แล้วนั้นคือมากกว่าร้อยละ 20 จะเกิด CHD ภายในเวลา 10 ปีข้างหน้า จึงจัดเป็น CHD risk equivalents ดังกล่าว

จะเห็นว่าเมื่อพิจารณาจาก risk factors ถ้าหากมีความเสี่ยงเกินร้อยละ 20 ในเวลา 10 ปี จะถือว่ามีความเสี่ยงสูงสุดต้องรักษาให้แอลดีแอลลงต่ำกว่า 100 mg/dl ถ้าหากความเสี่ยงต่ำกว่าร้อยละ 20 จะจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งจะต้องรักษาให้แอลดีแอลลงต่ำกว่า 130 mg/dl ส่วนในกลุ่มที่ 3 จะมีความเสี่ยงต่อ CHD ในเวลา 10 ปีต่ำกว่าร้อยละ 10 จึงรักษาให้แอลดีแอลลงต่ำกว่า 160 mg/dl ก็พอ (อภิชาติ และคณะ, 2546)

การประเมินความเสี่ยงก่อนเริ่มรักษา

ในการประเมินความเสี่ยงที่จะเกิดโรคนั้นนอกจากจะดูที่ระดับของแอลดีแอลแล้วยังต้องดูหัวข้ออื่นประกอบอีก 3 หัวข้อคือ

1. ผู้ป่วยมีโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารี (coronary heart disease, CHD) อยู่แล้วหรือไม่
2. ผู้ป่วยมีโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerotic disease) ในรูปแบบอื่นอยู่หรือไม่ (peripheral arterial disease, abdominal aortic aneurysm, carotid artery disease ที่มีอาการ)
3. ผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ นอกจากการเพิ่มระดับแอลดีแอลอยู่หรือไม่

ผู้ที่ระดับความเสี่ยงสูงที่สุดคือผู้ที่มีโรค CHD และ CHD risk equivalents ซึ่งประการหลังนี้นับรวมผู้ป่วยดังต่อไปนี้ (ข้อใดข้อหนึ่ง)

1. มีโรคหลอดเลือดแข็งในรูปแบบอื่นอยู่แล้ว
2. มีโรคเบาหวาน
3. มีปัจจัยเสี่ยงที่นำมาคำนวณแล้วมีความเสี่ยงในการเกิด CHD ใน 10 ปีข้างหน้าเกินกว่าร้อยละ 20

ทั้งสามหัวข้อนี้จัดว่ามีความเสี่ยงในการเกิด major coronary events เทียบเท่ากับผู้ที่ เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีอยู่แล้วนั้นคือมากกว่าร้อยละ 20 จะเกิด CHD ภายในเวลา 10 ปีข้างหน้า จึงจัดเป็น CHD risk equivalents ดังกล่าว

จะเห็นว่าเมื่อพิจารณาจาก risk factors ถ้าหากมีความเสี่ยงเกินร้อยละ 20 ในเวลา 10 ปี จะถือว่ามีความเสี่ยงสูงสุดต้องรักษาให้แอลดีแอลลงมต่ำกว่า 100 mg/dl ถ้าหากความเสี่ยงต่ำกว่าร้อยละ 20 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งจะต้องรักษาให้แอลดีแอลลงมต่ำกว่า 130 mg/dl ส่วนในกลุ่มที่ 3 จะมีความเสี่ยงต่อ CHD ในเวลา 10 ปีต่ำกว่าร้อยละ 10 จึงรักษาให้แอลดีแอลลงต่ำกว่า 160 mg/dl ก็พอ (อภิชาติ และคณะ, 2546)

การตรวจสอบภาวะไขมันในเลือดสูงโดยการวัดระดับไขมันในเลือด (lipoprotein profile)

การที่เราจะทราบว่ามีไขมันในเลือดสูงหรือไม่นั้น จำเป็นต้องตรวจเลือด ดังภาพที่ 5 ในการตรวจเลือดต้องมีการเตรียมตัวก่อนเจาะเลือดดังนี้

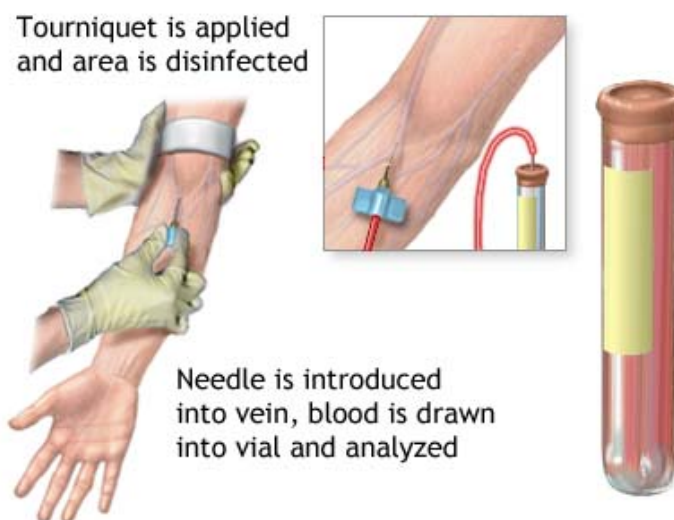
1. งดอาหารประมาณ 9-12 ชั่วโมง โดยให้ดื่มน้ำเปล่าได้
2. รับประทานอาหารดังเช่นที่รับประทานอยู่ประจำ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 สัปดาห์ก่อนเจาะเลือด

3. ผู้ที่ตั้งครรภ์ ผู้ที่ป่วยหนัก เช่น ได้รับอุบัติเหตุอย่างรุนแรง ผู้ป่วยหลังผ่าตัด ผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อ ผลการตรวจไขมันในเลือดอาจคลาดเคลื่อนได้ ควรตรวจเมื่อหายจากภาวะดังกล่าวแล้วอย่างน้อย 12 สัปดาห์

4. ผู้ป่วยที่มีกล้ามเนื้อหัวใจตายอย่างฉับพลัน (acute myocardial infarction) ควรเจาะเลือดภายใน 12 ชั่วโมงแรก หรืออย่างน้อย 6 สัปดาห์หลัง acute myocardial infarction จึงจะได้ค่าที่เป็นจริง อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการตรวจเลือดที่พ้นระยะ 12 ชั่วโมงแรกไปแล้วยังมีประโยชน์ โดยที่ถ้าหากระดับไขมันสูงกว่ามาตรฐานที่ควรสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีก็แสดงว่าผู้ป่วยมีระดับไขมันในเลือดจริง สามารถให้การรักษาได้โดยไม่ต้องรอเป็นระยะเวลาถึง 6 สัปดาห์

5. ผู้ป่วยที่มีโรคหลอดเลือดสมองฉับพลัน ควรตรวจวัดระดับไขมันในเลือดทันที (ภายใน 48 ชั่วโมง) หรือหลังจากนั้น 12 สัปดาห์

เทคนิคการเจาะเลือดและการตรวจวัดระดับไขมัน ดังนี้ 1) ควรให้ผู้ป่วยในท่านั่งอย่างน้อย 5 นาทีก่อนเจาะ เพราะการเปลี่ยนท่าจะทำให้ plasma volume เปลี่ยนแปลง และผลที่ได้จะคลาดเคลื่อน 2) ควรเก็บเลือดที่ได้ในหลอดที่ไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อที่จะให้ได้เป็นระดับไขมันในซีรัมแต่หากจำเป็นก็อาจใช้หลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้ ค่าที่ได้จะเป็นระดับไขมันในพลาสมา ซึ่งจะต่ำกว่าใน serum ประมาณร้อยละ 3 3) ควรส่งเลือดไปตรวจในห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานเชื่อถือได้ คือมี quality assurance และ quality control ที่ตรวจสอบมาตรฐานของระดับคอเลสเตอรอลหลาย ๆ ระดับโดยเฉพาะในระดับคอเลสเตอรอล ตั้งแต่ 100 mg/dl ถึง 300 mg/dl โดยใช้วิธีเอนไซม์มาติก (อภิชาติ และคณะ, 2546)



ภาพที่ 5 Blood test

ที่มา: Lindberg (2007)

Atherosclerosis

ในปี ค.ศ. 1829, Lobstein กำหนดชื่อทั่วไป (generic term) ของ “arteriosclerosis” ให้หมายถึงแผลเป็น (scarring) และการมีแคลเซียมเกาะ (calcification) ที่หลอดเลือดแดง (arteries) ในปี ค.ศ. 1904, Marchand จำแนก arteriosclerosis ตาม lipid-rich deposits

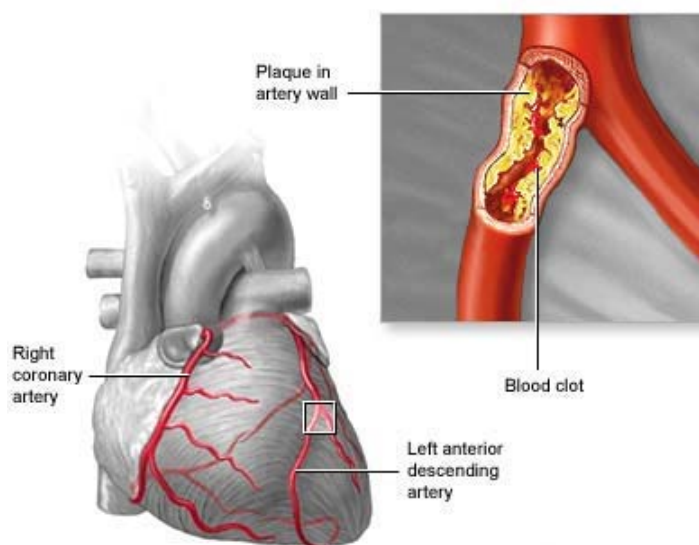
โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerotic diseases) สามารถนำไปสู่โรคหัวใจซึ่งเป็นสาเหตุการตายที่พบบ่อยในประเทศที่มีการพัฒนาทางอุตสาหกรรม ดังภาพที่ 6 ปัจจุบันพบว่า การปรับเปลี่ยน risk factor การควบคุมจำนวนคอเลสเตอรอลในอาหาร และการรักษาด้วยยาสามารถป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งซึ่งนำไปสู่โรคหัวใจชนิดต่าง ๆ ได้ ผนังหลอดเลือดแดง (arterial wall) ของคนปกติมีสามชั้นคือ

1. Intima (ชั้นในสุดที่สัมผัสกับกระแสเลือด) ประกอบด้วย endothelial cells
2. Media (ชั้นกลาง) ประกอบด้วย smooth muscle cells และ connective tissues ที่มี elastin, collagen, mucoproteins และ glycoproteins

3. Adventicia (ชั้นนอก) ประกอบด้วย connective และ adipose tissues

ผนังหลอดเลือดแดงของคนปกติจะมี lipids ต่ำมาก เฉพาะ lipoproteins ที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น เอชดีแอล จึงจะสามารถผ่าน endothelial lining ของหลอดเลือดแดงได้ สำหรับแอลดีแอลสามารถเจาะผ่าน intima ได้ แต่จะไม่สามารถผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) ที่มีขนาดเล็กกว่า ส่วน วีแอลดีแอลและไลโปโปรตีน ไคโลไมครอน ไม่สามารถผ่าน endothelium ที่มีสภาพปกติ

การที่แอลดีแอลถูกจับโดย specific receptor ที่อยู่ใน intima จึงเกิดการปล่อยโปรตีน และ lipids ซึ่งจะถูกสลายโดย esterases และ proteases เป็น amino acids, glycerol, phosphoric acid, choline, fatty acids และ cholesterol ก่อน Metabolic fate ของคอเลสเตอรอลเป็นบ่อเกิดของ atherogenesis จากการที่ sterol moiety ของคอเลสเตอรอลไม่สามารถถูกทำลายในผนังของหลอดเลือดแดงคอเลสเตอรอลจึงอาจถูกเก็บสะสมให้อยู่ภายในเซลล์กลายเป็น foam cells หรืออาจถูกพากลับไปตับโดยเอชดีแอล (พรทิพย์, 2536)



ภาพที่ 6 Atherosclerosis

ที่มา: Lindberg (2007)

ผนังหลอดเลือดแดงที่มี atherosclerosis

เมื่อแรกคลอดผนังหลอดเลือดแดงที่ชั้น intima media และ adventicia จะถูกแยกจากกันโดย elastic laminae ในวัยเด็ก laminae จะขาด (rupture) และ intima จะเริ่มหนาขึ้น ขั้นต่อมาจะมีการสร้าง collagen I และ II ในเส้นเลือดแดงของคนปกติ แต่ถ้าเป็นเส้นเลือดแดงของผู้ที่เป็น atherosclerosis จะมีการหลั่ง collagen III ขณะที่เกิด atherosclerosis จะมีการแยก (breache) ในผนังของหลอดเลือดแดงโดยเฉพาะที่รอยต่อ (junctions) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความดันสูง angiotensin catecholamine nicotin และ lipoproteins ทำให้เซลล์เพิ่ม permeability ต่อแอลดีแอลเกิดเป็นทางสีเหลือง (yellow streaks) บน intima เมื่อนำ lipids ไปทดสอบพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายซีรัมแอลดีแอล นอกจากนี้ยังพบเกร็ดเลือด (blood platelets) ใน intima การเกิด calcification ทำให้ arterial lumen แคบลงและเกิด atheromatous plaque

atherosclerotic lesions (ภาพที่ 7) จากหลอดเลือดแดงพบว่า coronary arteries จะมี

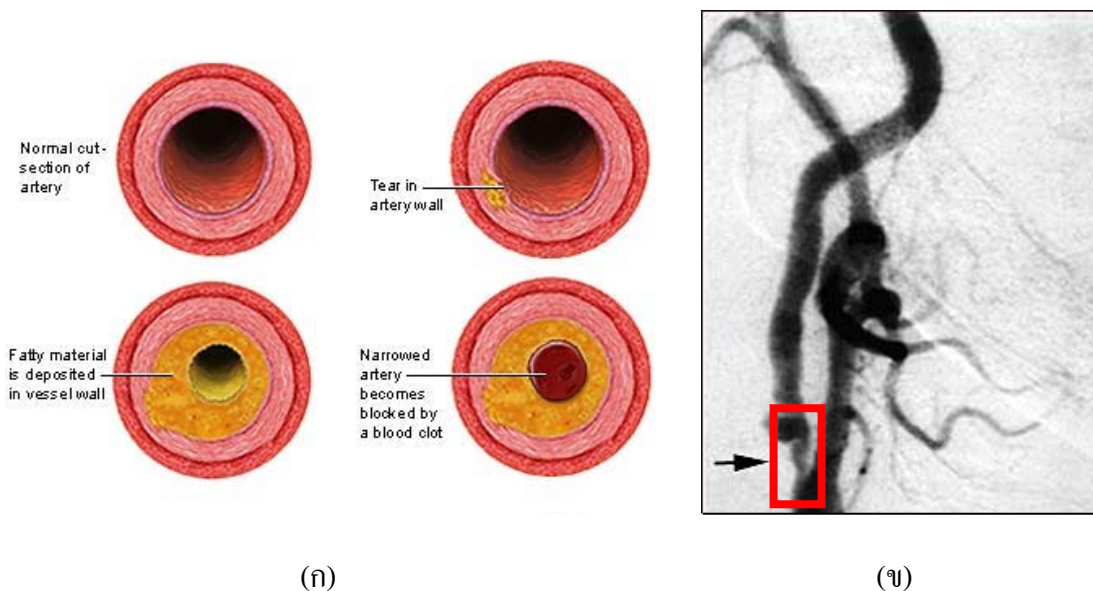
1. Fibromuscular intimal thickening ที่อายุ 20 ปี จะหนาเท่ากับความหนาของ media ซึ่งถือว่าปกติ เนื่องจากจะพบลักษณะดังกล่าวในหลอดเลือดแดงของคนทุกเพศ ทุกวัย ในทุกกลุ่มประชากร

2. The fatty streak การเปลี่ยนแปลงแบบ atherosclerosis เริ่มเกิดในชั้น intima และ media ด้านในของหลอดเลือดแดงที่มีปัญหาจะพบการทับถมของ lipids ใน smooth muscle cells interstitial spaces และ macrophages ที่ชั้นของ lipid จะเห็นเป็นจุดหรือสีเหลือง (opaque yellow dots or streaks) บนชั้นผิวของ intima ดังนั้น จึงให้ชื่อทางสีเหลืองว่า fatty streaks ซึ่งถ้านำไปย้อมด้วยสี Sudan IV จะมองเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า lipids ที่พบเป็นพวก cholesterol และ cholesterol esters (cholesterol oleate ซึ่งพบน้อยในพลาสมา) จะเริ่มพบ fatty streaks ที่เส้นเลือดแดงใหญ่ที่ออกจากหัวใจ (aorta) เมื่อเรามีอายุ 2-3 ขวบแรก จากนั้น fatty streaks จะเริ่มกระจายตัวครอบคลุมผิว aorta จึงจะพบ fatty streaks ที่ fibromuscular intimal layer ของ coronary arteries ที่ช่วงใกล้อายุ 20 ปี ความหนาจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงอายุ 30 ปี

3. The fibrous plaque arteries ของผู้ใหญ่จะมีการสะสม intimal plaques ซึ่งประกอบด้วย lipids ถูกห่อหุ้มด้วย capsule of smooth muscle and connective tissue มีสีเทาที่เราเรียกว่า fibrous plaques ซึ่งมี cholesterol และ cholesterol esters เป็นส่วนประกอบที่มี fatty acid ประเภท linoleate

เหมือน esters ของ lipoproteins ที่พบในพลาสมา จะเริ่มพบ fibrous plaque เมื่อเข้าวัย 30 ปี และ plaque จะหนาขึ้นเรื่อยในวัยอายุ 40 จนถึง 50 ปี อาจพบ fibrous plaque ที่ cerebral arteries ที่ช่วงอายุ 50

4. Complicated lesions สำหรับ fibrous plaque บางอันจะจับแคลเซียมไว้ที่แกนกลาง fibrous plaque จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนในที่สุดเกิด stenosis ของ coronary artery lumen การเกิดแผลเปื่อย (ulceration) ที่ส่วนในของ fibrous plaque capsule มีการแตกเลือด (hemorrhage) เกิดใน plaque ของ small vessels การเกิด ulceration หรือ hemorrhage ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น เกิดการอุดตันใน lumen ของ coronary artery ทำให้เกิดภาวะ myocardial infarction นอกจากนี้ยังอาจมี thrombosis เกิดบนผิวของ fibrous plaque (พรทิพย์, 2536)



ภาพที่ 7 (ก) Carotid stenosis, X-ray of the right artery

(ข) Developmental process of atherosclerosis

ที่มา: Lindberg (2007)

Etiologic และ pathogenetic mechanisms ใน atherogenesis

สิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง รายละเอียดมีดังนี้

1. Hyperlipidemia

1.1 Dietary-genetic interaction บรรดาปัจจัยเสี่ยง (risk factors) ต่าง ๆ hyperlipidemia หรือพูดให้ชัดเจนลงไปก็คือ การมีระดับแอลดีแอลในพลาสมาสูงกว่าปกติ ทำให้เกิด atherogenesis ได้มากที่สุดแอลดีแอลที่มีมากในพลาสมาเป็นผลจาก interaction ระหว่าง susceptible genotype และอาหารที่มี cholesterol และ saturated fat จำนวนมาก สำหรับผลจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับบุคคลแต่ละคนซึ่งจะมีผลไม่เท่ากัน เช่น ในผู้ที่มีประวัติ familial hypercholesterolemia กรรมพันธุ์มีบทบาทสำคัญในการเป็น risk factor แต่ถ้านั้นไม่มีประวัติดังกล่าว อาหารอาจเป็น risk factor ที่สำคัญ จากการศึกษาพบว่า ผู้ที่เป็น CHD จะมีระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมาสูงกว่าคนที่ไม่เป็นโรค ดังนั้น จึงใช้ระดับของพลาสมาคอเลสเตอรอลในการทำนาย risk factor ต่อ CHD

1.2 Lipoproteins พบว่า lipoproteins แต่ละชนิดมีความสัมพันธ์ต่ออัตราเกิด atherosclerosis แตกต่างกัน ในคนพบแอลดีแอลในเลือดมีความสัมพันธ์กับ atherosclerosis โดยตรง ขณะที่ระดับของเอชดีแอลในเลือดมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกันคือระดับเอชดีแอลสูงจะช่วยป้องกัน atherosclerosis ได้สำหรับความสัมพันธ์ของระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาต่อการเกิด atherosclerosis ยังมีการศึกษาไม่แน่ชัด นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาในสัตว์ทดลอง และพบว่า chylomicron remnants ซึ่ง triglycerides-rich lipoproteins สามารถเป็น atherogenic ได้มากกว่า lipoproteins ชนิดอื่น

1.3 Apolipoproteins Apo B ในพลาสมาเป็นตัวทำให้เกิด atherosclerosis ส่วน Apo A1 เป็นตัวช่วยป้องกันโรค

1.4 Lipoprotein-cell interactions สำหรับ native LDL จะไม่ถูกจับกิน (ingested) โดย macrophages หรือ smooth muscle cells จนทำให้เกิดการสะสมของ lipids ระหว่างเซลล์ (intercellular lipids accumulation) อย่างไรก็ตาม macrophages จะสะสม cholesterol esters เมื่อถูก exposed ต่อ acetylated LDL ต่อ beta VLDL สรุปก็คือ การเพิ่มระดับของ lipoproteins ในพลาสมา โดยเฉพาะ low density Apo B containing lipoproteins มีความเชื่อมโยงกับการเกิด atherosclerosis

2. Hypertension เป็นตัวทำนายการเกิด CHD ที่สำคัญที่มีผลต่อ cerebral arteries ความดันสูงมีความสัมพันธ์ต่อ fibrous plaques มากกว่า fatty streaks

3. การสูบบุหรี่ เพิ่มอัตราเสี่ยงต่อ CHD peripheral vascular disease และ aortic aneurysms พบว่าคนสูบบุหรี่มีระดับเอชดีแอลต่ำกว่าคนไม่สูบ นอกจากนี้คนที่สูบบุหรี่ยังมีเม็ดเลือดขาวสูงมีระดับ fibrinogen สูง ซึ่งอาจจะ predispose ต่อ thrombosis บนผิวของ atherosclerotic plaque

4. เพศชายมีอัตราเสี่ยงต่อ CHD มากกว่าเพศหญิง แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด (พรทิพย์, 2536)

Cellular components ของ atherosclerosis

Endothelium เป็น barrier ระหว่าง circulating blood และ arterial intima ดังนั้นถ้า endothelium มีความผิดปกติจะทำงานไม่สมบูรณ์ทำให้เกิด atherogenesis

Smooth muscle เป็นเซลล์ที่มีมากในผนังหลอดเลือดแดงและจะสะสม lipids ในระยะเริ่มแรกๆที่เริ่มเป็น ทำให้กลายเป็น fibrous plaque นอกเหนือจากทำหน้าที่ contracting แล้ว smooth muscle cells ยังทำหน้าที่ผลิต collagen และ elastin จากการศึกษพบว่า smooth muscle cell มีส่วนเกี่ยวข้องกับ atherogenesis แต่จะไม่ใช่ตัวริเริ่มกระบวนการ

Macrophage พบ macrophages ใน intima ของ coronary arteries ของเด็กก่อนจะถึงอายุ 5 ปี และจะพบมากขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น ใน fatty streak จะพบ macrophages จับกับ lipids (clusters of lipid-filled macrophages) ซึ่งเป็น lesion ที่พบในตอนต้นของ atherosclerosis มีผู้สันนิษฐานว่า lower-density, Apo B containing lipoproteins (triglycerides-rich lipoproteins, native LDL หรือ modified LDL) จะแทรกซึม intima และถูกจับกินโดย macrophages เมื่อจำนวนเพิ่มมากขึ้นทำให้เห็นเป็น fatty streak การทับถมของ lipids เกิดการแพร่ขยาย นำไปสู่ fibrous plaque ดังนั้น macrophages จึงร่วมอยู่ในกระบวนการดังกล่าวโดยตรง

Platelets หรือ เกร็ดเลือด มีหน้าที่ในการห้ามเลือด (hemostasis) และการเกิดลิ่มในหลอดเลือด (thrombosis) แต่หน้าที่ของ platelets ในขั้นตอนการเกิด atherogenesis นั้นยังไม่มีการสรุปที่แน่นอน สรุป ข้อสันนิษฐานการเกิด atherogenesis ที่น่าเชื่อถือคือ interactions ของ specific lipoproteins กับ endothelium macrophage และ smooth muscle (พรทิพย์, 2536)

ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจแข็ง

ปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจแข็งต่างก็มีผลเป็นเอกเทศต่อกัน ในส่วนของระดับคลอเลสเตอรอลรวม และแอลดีแอลที่สูงกว่าปกติมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันอย่างชัดเจน ส่วนระดับเอชดีแอลที่ต่ำกว่าปกติก็มีส่วนเช่นเดียวกัน ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย ได้วางแผนการคัดกรองระดับไขมันในเลือดที่อยู่ในระดับปกติในปีพุทธศักราช 2545 ดังตารางที่ 2 ข้อมูลปัจจุบันบ่งชี้ว่าระดับแอลดีแอลที่สูงขึ้นเป็นสาเหตุสำคัญหลักในการก่อโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ซึ่งเป็นสาเหตุการตายอย่างเฉียบพลันจากกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction, MI) ที่พบได้บ่อยมากทั้งในต่างประเทศ และประเทศไทย และการลดแอลดีแอลสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ (อภิชาติ และคณะ, 2546)

ตารางที่ 2 ระดับไขมันที่ปกติหรือมีความเสี่ยงต่ำต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน

ชนิดของไขมัน	ระดับไขมันที่เหมาะสม	
คลอเลสเตอรอลรวม	น้อยกว่า	200 mg/dl
แอลดีแอล	น้อยกว่า	130 mg/dl
เอชดีแอล	มากกว่าหรือเท่ากับ	40 mg/dl
ไตรกลีเซอไรด์	น้อยกว่า	150 mg/dl
อัตราส่วนของ คลอเลสเตอรอลรวม/เอชดีแอล	น้อยกว่า	4.5
อัตราส่วนของแอลดีแอล/เอชดีแอล	น้อยกว่า	3

คลอเลสเตอรอลเป็น mmol/L = mg/dl x 0.02586

ไตรกลีเซอไรด์เป็น mmol/L = mg/dl x 0.01129

ที่มา: อภิชาติ และคณะ (2546)

การที่ระดับแอลดีแอลสูงขึ้น และทำให้เกิดโรคหลอดเลือดแข็งนั้น เชื่อว่าเกิดจากการมี oxidative modification บนอนุของแอลดีแอลที่มีเพิ่มขึ้นและไปสัมผัสกับอนุมูลอิสระ (free radical) ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในกระแสเลือด อนุของออกซิไดซ์แอลดีแอล (oxidized LDL) ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลให้ตัวรับแอลดีแอลไม่สามารถรับแอลดีแอลที่เปลี่ยนแปลงไปเข้าสู่เซลล์ แต่ตัวรับบนแมโครเฟจ (macrophage receptor) ยังสามารถรับออกซิไดซ์แอลดีแอลที่เพิ่มขึ้นเข้าสู่เซลล์อย่างไม่จำกัด และทำให้อนุภายในแมโครเฟจ (macrophage) อัดแน่นไปด้วยคลอเลสเทอรอลเอสเทอร์และเปลี่ยนไปเป็นโฟมเซลล์ (foam cell) ที่พบได้เสมอในส่วนที่หนาตัวของหลอดเลือด ในรายที่มีหลอดเลือดแข็งเรียกบริเวณส่วนที่หนาตัวนี้ว่า atheroma หรือ atherosclerotic plaque ซึ่งอาจทำให้หลอดเลือดตีบลงจนเกิดอันตรายได้ (จิรเดช และคณะ, 2547) กลไกการเกิด atherosclerosis มี 4 กลไก คือ 1) จับกับ scavenger receptor ของแมโครเฟจทำให้คลอเลสเทอรอลเข้าสู่เซลล์มากขึ้นเนื่องจาก scavenger receptor ไม่ถูกควบคุมโดย down regulation 2) ฤทธิ์ยับยั้งแมโครเฟจไม่ให้ออกจากชั้น intima ของหลอดเลือดทำให้มีการเพิ่มจำนวนของแมโครเฟจรอบหลอดเลือด 3) chemotactic effect ต่อ โมโนไซต์ (monocyte) ในกระแสเลือด ทำให้โมโนไซต์ที่ออกจากหลอดเลือดมากขึ้น 4) มีฤทธิ์ cytotoxic ต่อ endothelial cell และกล้ามเนื้อรอบหลอดเลือด (Gibert, 1992 ; Steinberg, 1989)

นอกจากนี้ออกซิไดซ์แอลดีแอลยังกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokines และ growth factor ต่าง ๆ จากเซลล์บุหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อ และแมโครเฟจ ทำให้เกิดปฏิกิริยาและการสังเคราะห์เซลล์ และโปรตีนต่าง ๆ เช่น คอลลาเจนผิดปกติไปทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดจนมีลักษณะของหลอดเลือดแข็งได้ (นีโลบล, 2542) ได้มีการศึกษาถึงบทบาทของ สารแอนติออกซิแดนซ์ต่อขบวนการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นที่แอลดีแอลในหลอดทดลอง พบว่า วิตามินซีซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ตัวหนึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนเหล็กที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (Fe^{3+}) ให้กลับมายู่ในรูปรีดิวซ์ (Fe^{2+}) มีผลให้กระบวนการออกซิไดซ์ของแอลดีแอลถูกยับยั้งด้วย (Pitaknantakul, 1998) นอกจากนี้จากการทดลองโดยให้สารแอนติออกซิแดนซ์ในสัตว์ทดลองที่ทำให้แอลดีแอลสูงขึ้นผิดปกติ พบว่าการเกิดหลอดเลือดแข็งในกลุ่มที่ได้รับสารแอนติออกซิแดนซ์จะน้อยกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับ ส่วนการศึกษาในผู้ป่วยที่มีโรคหลอดเลือดแข็งและมีระดับแอลดีแอลสูง การให้ยาเพื่อควบคุมระดับแอลดีแอลลงสู่ระดับปกติ จะลดความหนาของผนังหลอดเลือดลงได้ (นีโลบล, 2542)

การนำคลอเลสเทอรอลเข้าสู่เซลล์ผ่านตัวรับแอลดีแอลนั้น พบว่าเซลล์ปกติจะสามารถได้รับคลอเลสเทอรอลได้สองทางคือ การสร้างจากเซลล์นั้น ๆ และรับจากกระแสเลือด คลอเลสเทอรอลในกระแสเลือดจะไปรวมกับโปรตีนอื่น ๆ เป็นแอลดีแอลและจะถูกนำเข้าสู่เซลล์

โดยผ่านทางตัวรับแอลดีแอลโดยกระบวนการเอนโดไซโทซิส คอลเลสเตอรอลในเซลล์จะถูกปรับให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยคอลเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นจะไปยับยั้งกระบวนการในการสร้าง endogenous cholesterol โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) นอกจากนี้คอลเลสเตอรอลในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นยังมีผลไปลดการสร้างตัวรับแอลดีแอลอีกด้วย ทำให้สามารถลดคอลเลสเตอรอลในเซลล์ได้ทั้งจากคอลเลสเตอรอลจากแหล่งภายในและภายนอก (จิรเดช และคณะ, 2547 ; Cooper and Hausman, 2004)

ภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฏิมภูมิ (Familial Hypercholesterolemia, FH)

ภาวะคอลเลสเตอรอลสูงในเลือดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดหัวใจแข็ง (atherosclerosis) และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (coronary heart disease, CHD) (สมเกียรติ, 2547) ผู้ใหญ่อายุกว่า 40 ปีขึ้นไปมักมีคอลเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือดสูงคือมากกว่า 200 mg/dl ผู้ที่มีคอลเลสเตอรอลสูงในเลือดเป็นเวลานาน มีโอกาสเป็นโรคได้หลายอย่าง คอลเลสเตอรอลในร่างกายมีความสัมพันธ์กับอาหารที่รับประทาน และรูปแบบการดำเนินชีวิตมาก การศึกษาเรื่องราวของคอลเลสเตอรอลจึงช่วยให้สามารถกำหนดบทบาทของชีวิตด้านอาหาร การกินและการออกกำลังกายได้เหมาะสมยิ่งขึ้น โรคหนึ่ง que เชื่อว่าเกิดจากการที่มีคอลเลสเตอรอลสูงเป็นเวลานานคือโรคหลอดเลือดหัวใจแข็ง (atherosclerosis) โรคนี้เกิดจากการเกาะตัวกันของไขมันภายในผนังเส้นเลือด ไขมันที่เกาะตัวกันเรียกว่า plaque ซึ่งเกิดจากการมีคอลเลสเตอรอลในเลือดสูง หากเกิด plaque ขึ้นโดยต่อเนื่อง หลอดเลือดจะตีบและทำให้เลือดไหลผ่านได้ยากขึ้น ในกรณีที่หลอดเลือดนั้นส่งเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ อาจทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวได้ หากเป็นหลอดเลือดที่ส่งเลือดไปเลี้ยงสมอง ก็อาจทำให้เกิดภาวะเส้นเลือดสมองอุดตันหรือเส้นโลหิตในสมองแตกได้ ภาวะคอลเลสเตอรอลสูงจึงเป็นภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง โรคหลอดเลือดแข็งเป็นโรคที่ไม่มีอาการแสดงให้เห็นเมื่อเริ่มเป็น จะทราบว่าเป็นโรคก็ต่อเมื่อเกิดอาการเจ็บป่วยให้เห็นเนื่องจากเป็นมากแล้ว จึงต้องมีการตรวจเลือดหาระดับของคอลเลสเตอรอลในเลือดเป็นประจำ การตรวจเลือดที่ให้ผลถูกต้องควรจะตรวจเลือดภายหลังจากงดอาหารนาน 12 ชั่วโมง (สมเกียรติ, 2547)

คอลเลสเตอรอลเป็นอนุพันธ์ของไขมัน แม้ว่าจะมีการจับตัวกับไขมันอยู่เสมอ ๆ ก็ไม่จัดว่าเป็นไขมัน แต่แยกออกไปเป็นอีกประเภทหนึ่ง พบในเซลล์สัตว์ทุกเซลล์และไม่พบในพืช แต่พืชบางชนิดมีสารที่สัมพันธ์กับคอลเลสเตอรอลหลายรูปแบบด้วยกัน คอลเลสเตอรอลในเลือดพบได้ 2 รูป คือ ในรูปคอลเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) และคอลเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester)

ซึ่งไฮดรอกซิลของคลอเลสเตอรอลจับตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยมีเอนไซม์ acyl cholesterol acyl transferase (ACAT) เป็นตัวช่วย (วิชัย, 2545)

การเคลื่อนย้ายหรือขนส่งคลอเลสเตอรอลในร่างกายใช้โปรตีนที่ชื่อว่า ไลโปโปรตีน ซึ่งมีแกนกลางเป็นไขมันชนิดไม่มีขั้ว (nonpolar lipid) เช่น ไตรกลีเซอไรด์ คลอเลสเตอรอลเอสเทอร์ เป็นต้น และล้อมรอบด้วยไขมันชนิดที่ละลายน้ำได้บางส่วน (amphipatic lipid) เช่น ฟอสโฟลิปิด คลอเลสเตอรอล เป็นต้น และมีโปรตีนที่เรียกว่า อะโปโปรตีน (apoprotein) แทรกอยู่ในชั้นของไขมันเหล่านี้โดยทำหน้าที่จับกับตัวรับแอลดีแอลที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ตามอวัยวะต่าง ๆ (นิโลบล, 2542)

ไลโปโปรตีน (Lipoprotein)

ไลโปโปรตีนแบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามลำดับชั้นเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังสูง (ultracentrifuge) ได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ ไคโลไมครอน (chylomicrons) ทำหน้าที่หลักในการขนส่ง ไตรกลีเซอไรด์ จากลำไส้เล็กไปยังตับวิแอลดีแอล (very low density lipoprotein, VLDL) ทำหน้าที่ขนส่ง ไตรกลีเซอไรด์ จากตับ ไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ แอลดีแอล (low density lipoprotein, LDL) ประกอบด้วยคลอเลสเตอรอล เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งจะขนส่งคลอเลสเตอรอลเหล่านี้ไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ เอชดีแอล (high density lipoprotein, HDL) ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดมากที่สุด และจะมีคลอเลสเตอรอลรองลงมา จะทำหน้าที่ในการขนส่งไขมันเหล่านี้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไปกำจัดยังตับ ดังตารางที่ 3 (นิโลบล, 2542)

ตารางที่ 3 ลักษณะเฉพาะและส่วนประกอบของไลโปโปรตีนชนิดต่าง ๆ

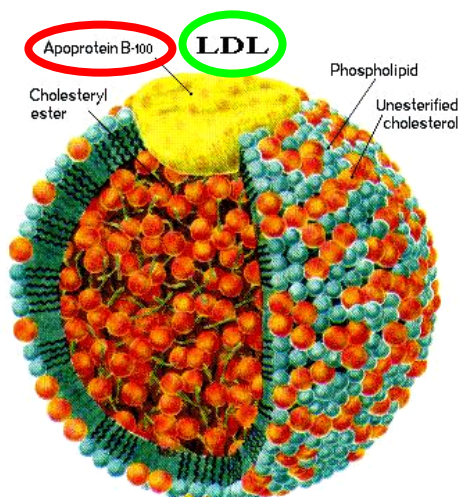
Lipoprotein Class	Density (gm/ml)	Floatation rate Sf	MW (D)	Diameter (nm)	% by weight of Lipid, Protein	Major core lipids	Major Apoprotein (Minor)
Chylomicron	<1.006	>400	$>0.4 \times 10^9$	>70	98, 2	Dietary TG	B 48, 100, C I, II, III
VLDL	<1.006	20-400	$5-10 \times 10^6$	25-80	92, 8	Endogenous TG	B 100, C I, II, III
IDL	1.006-1.019	12-20	$4-4.8 \times 10^6$	22-25	85, 15	CE, TG	B 100
LDL	1.019-1.063	0-12	2.8×10^6	18-22	79, 20	CE	B 100
HDL	1.063-1.210	-	3.6×10^6	7-10	50, 50	PL, CE	AI, II

ที่มา: นิโลบล (2542)

Low density lipoprotein cholesterol, LDL

แอลดีแอลมีอนุภาคกลมขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 nm low density lipoprotein (แอลดีแอล: density : $1.006 < d < 1.063$; electrophoretic mobility : beta) สัดส่วนของแอลดีแอลแต่ละอนุภาคประกอบด้วยร้อยละ 40-50 ของ lipoprotein แอลดีแอลประกอบด้วย lipid fraction (78%) คือ triglyceride (10%), free cholesterol (8%), esterified cholesterol (37%), phospholipid (22%), nonesterified fatty acid (1%) และ โปรตีนขนาดใหญ่ฝังตัวอยู่ในชั้นไขมัน (protein fraction) (22%) คือ อะโพลipoprotein บี100 (apoprotein B100, Apo B100) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 500,000 ดาลตัน ดังภาพที่ 8 ซึ่งโปรตีนนี้จะถูกจดจำด้วยตัวรับแอลดีแอลที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ จะเห็นว่าแอลดีแอลประกอบด้วย cholesterol ปริมาณสูง (45%) แอลดีแอลมีสองประเภทคือ ไอดีแอล (intermediate-density lipoproteins, IDL) และแอลดีแอล ซึ่งเกิดจากการสลายตัว (degradation) ของ วีแอลดีแอลเป็น ไอดีแอล ซึ่งสลายตัวต่อไปกลายเป็นแอลดีแอล คุณสมบัติของการดูดซับความชื้น (hydrophilic) ที่เคลือบอยู่บนผิวโมเลกุลของแอลดีแอลช่วยให้แอลดีแอลแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ ทำให้แอลดีแอลมีคุณสมบัติของการก่อโรคชนิด metabolic disorders แอลดีแอลถ้ามีจำนวนมากจะไม่ทำให้พลาสมาข้น

ร่างกายสร้างแอลดีแอลจากพลาสมาวีแอลดีแอลโดยผ่านมาทางไอดีแอล กระบวนการทำลายแอลดีแอลเกิดที่เนื้อเยื่อนอกตับ (extrahepatic tissue) พบว่า บนผิวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cells) fibroblasts (เซลล์ของ connective tissue ที่สร้าง fibrous และ scar tissue) adipocytes และ lymphocytes ต่างมีตัวรับแอลดีแอลซึ่งสามารถจับกับแอลดีแอลดังนั้นแอลดีแอลจึงมี latent atherogenic properties คือ มีความสามารถแฝงในการถ่ายโอน lipids จำนวนที่มีมากเกินไปในเลือดให้ไปสะสมอยู่ที่ผนังของหลอดเลือด ความสามารถในการจับตัวของแอลดีแอลกับตัวรับแอลดีแอลจึงขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของ lipoprotein โดยเฉพาะ phospholipids และ อะโพลipoprotein บี (พรทิพย์, 2536 ; ลัดดา, 2547)



ภาพที่ 8 แอลดีแอลคอลลอสเตอรอลและอะโปโปรตีน บี100

ที่มา: พรทิพย์ (2536)

อะโปโปรตีน บี (Apoprotein B)

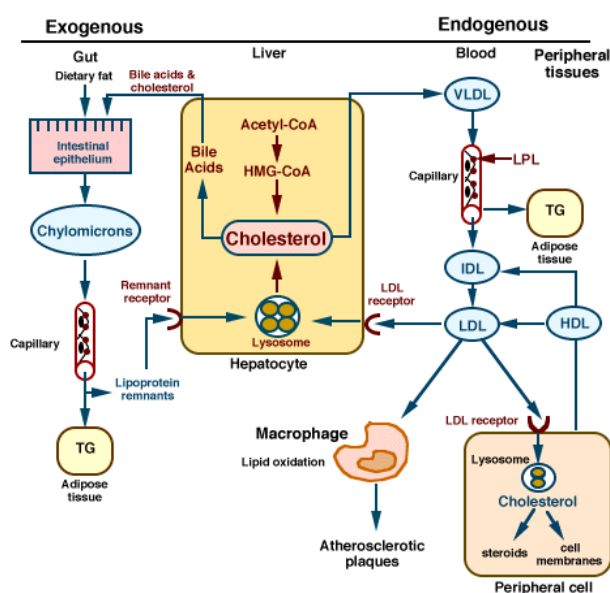
อะโปโปรตีน (apoproteins) หมายถึง โปรตีนพิเศษชนิดต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของ lipoproteins มีหน้าที่พา lipids ให้เคลื่อนไปในกระแสเลือด โดยจะกระตุ้น (activate) หรือยับยั้ง (inhibit) เอนไซม์ที่ร่วมในกระบวนการ lipid metabolism และทำหน้าที่เชื่อมโยง lipoproteins กับ lipoproteins receptors บนบริเวณผิวเซลล์

อะโปโปรตีน บี หรือ อะโป บี (apoprotein B หรือ Apo B) ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดไม่ละลายน้ำ เป็นโปรตีนองค์ประกอบของแอลดีแอล (95%) ประมาณ 40% เป็นองค์ประกอบของวีแอลดีแอล และไลโดไมครอน อะโป บี ไม่ละลายน้ำ จึงยากแก่การศึกษาเรื่องคุณสมบัติทางด้านเคมีและฟิสิกส์ อะโป บี มีสองชนิดแต่ส่วนใหญ่จะเป็น อะโป บี100 ซึ่งถูกสร้างที่ตับ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4,536 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 275,000 พบใน lipoproteins ที่มีต้นตอภายในร่างกาย (endogenous origin เช่น วีแอลดีแอลและแอลดีแอล) อะโป บี100 จะนำแอลดีแอลให้มุ่งไปที่ตัวรับแอลดีแอลสำหรับ อะโป บี48 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 264,000 มีต้นตอมาจากลำไส้ พบมาใน ไลโดไมครอน ที่มีต้นตอจากอาหาร (exogenous origin) ในพลาสมาของคนปกติเก็บหลังการงดอาหารจะพบ อะโป บี48 น้อยมาก แต่ผู้ป่วยที่มีปัญหาในการขับ chylomicron remnant เช่น ในโรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) จะพบระดับ ของ อะโป บี48 สูงผิดปกติ การที่ อะโป บี มี immunological properties ทำให้สามารถ ผลิต polyvalent antisera

และ monoclonal antibodies ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้วิเคราะห์ อะโพลี บี ในเลือด ปัจจุบันสามารถผลิต monoclonal antibodies ที่ทำปฏิกิริยาต่อจุดที่แตกต่างกันบนโมเลกุลของ อะโพลี บี ทำให้ทราบโครงสร้างของ อะโพลี บี อะโพลี บี จะถูกเปลี่ยนเป็น amino acid เฉพาะเจาะจงโดย lysosomal enzymes (พรทิพย์, 2536)

กระบวนการการทำลายแอลดีแอลภายในเซลล์

กระบวนการการทำลายแอลดีแอลภายในเซลล์ (ภาพที่ 9) ทำโดยการรวมตัวกับ lysosomes ซึ่งมีเอนไซม์ที่ทำลาย อะโพลีโปรตีน บี ร่วมกับกระบวนการ hydrolysis ของแอลดีแอลเกิดกลไกที่มีส่วนป้องกันการสะสมของคลอเลสเตอรอลภายในเซลล์ คือ 1) ะจับการทำงานของ HMG-CoA reductase ในการสร้าง sterol ทำให้อัตราการสร้าง cholesterol (endogenous production) ภายในร่างกายลดลง 2) ก่อสร้างตัวรับแอลดีแอลจึงช่วยป้องกันการจับเกาะของคลอเลสเตอรอลที่มาจากแอลดีแอล 3) ทำการ esterify cholesterol โดยอาศัย acyl CoA : acyl-cholesterol-acyl transferase (ACAT) ทำให้มีการ esterify cholesterol อีกและมีการเก็บสะสม cholesterol ester ไว้ถ้ามีจำนวนมากเกินไป (นิโลบล, 2542)



ภาพที่ 9 กระบวนการการทำลายแอลดีแอลภายในเซลล์

ที่มา: Clinical Pharmacology Review (2007)

การจำแนกโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระดับไลโปโปรตีนโดยดูความผิดปกติของระดับ คลอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด

ปัจจุบันมีการจำแนกความผิดปกติของ lipoprotein (lipoprotein disorders) ให้สามารถประยุกต์ใช้ทางปฏิบัติได้มากขึ้น โดยอิงความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ lipoprotein metabolism pathway เช่น lipoprotein จะถูกสะสมในเลือดได้เสมอในกรณีที่ 1) ขั้นตอนต่าง ๆ ของ pathway ถูกขัดขวาง 2) ร่างกายผลิต lipoproteins มากกว่าปกติ หรือ 3) เกิดความบกพร่องในระบบการกำจัด lipoproteins ออกจากร่างกาย เหล่านี้เป็นผลให้มีการสะสมของ lipoproteins ในกระแสเลือด ขณะเดียวกันการที่ 1) ร่างกายสร้าง lipoprotein ได้น้อยกว่าปกติ หรือ 2) การกำจัด lipoprotein ออกจากร่างกายมีมากกว่าปกติ ก็ทำให้ระดับของ lipid ในเลือดต่ำกว่าปกติได้ด้วย การจำแนกความผิดปกติของ lipoprotein แบบใหม่กำหนดความผิดปกติของ lipoprotein เป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ

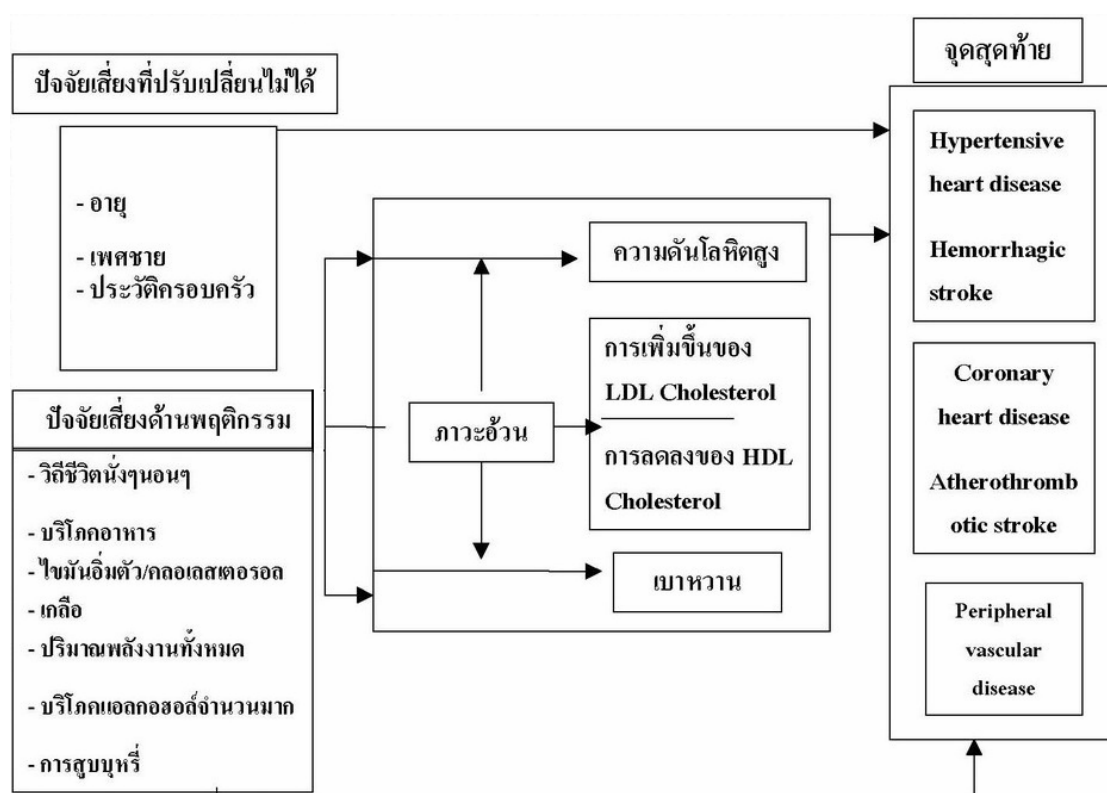
1. ความผิดปกติที่เกิดจากการมีระดับคลอเลสเตอรอลในเลือดสูงกว่าปกติ (disorders of hypercholesterolemia) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบบที่ได้มาแต่กำเนิด (primary) หรือ แบบที่ได้มาภายหลัง (secondary)
2. ความผิดปกติที่เกิดจากการมีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงกว่าปกติ (disorders of hyper triglyceridemia) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบบที่ได้มาแต่กำเนิด (primary) หรือ แบบที่ได้มาภายหลัง (secondary) เช่นกัน

ซึ่งจะพบความผิดปกติที่เกิดจากการมีระดับคลอเลสเตอรอลในเลือดสูงกว่าปกติมากกว่า ความผิดปกติที่เกิดจากการมีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงกว่าปกติ โดยความผิดปกติที่เกิดจากการมีระดับคลอเลสเตอรอลในเลือดสูงกว่าปกติ (disorders of hypercholesterolemia) อาจเป็นได้ทั้งแบบที่ได้มาแต่กำเนิด (primary) หรือ แบบที่ได้มาภายหลัง (secondary) ดังภาพที่ 10

Primary hypercholesterolemia อาจเป็นได้ทั้ง แบบที่เป็นมาแต่กำเนิด (congenital) คือ Familial hypercholesterolemia (FH) มีสาเหตุจากความผิดปกติของร่างกายในการกำจัดแอลดีแอล ทำให้แอลดีแอลสะสมอยู่ในกระแสโลหิตจำนวนมาก FH แบบที่เป็นสเทอโรไลด์สพบได้บ่อย คือ 1 ใน 200 หรือ 1 ใน 500 คน ผู้ป่วยประเภทนี้จะมีระดับคลอเลสเตอรอลประมาณ 200-500 mg/dl (5.18-12.95 mmol/l) ส่วนใหญ่จะไม่มีอาการแต่พบบางคนมี xanthomas สำหรับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) จะเกิดที่อายุ 40-50 ปี FH แบบที่เป็น โสโมไลด์สพบน้อยคือ

หนึ่งในล้านคน ผู้ป่วยจะมีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงประมาณ 500-1,000 mg/dl (12.95-25.9 mmol/l) ร่วมกับมี xanthomas และมีอาการปวดเค้นอก (angina pectoris) และอาการกล้ามเนื้อหัวใจวายก่อนอายุ 20 ปีแบบที่ได้มาภายหลัง (acquire) เชื่อกันว่า acquired hypercholesterolemia เกิดจากสาเหตุของสิ่งแวดล้อม เช่น จากการรับประทานอาหารที่มี cholesterol และ saturated fat สูงอาจทำให้คนบางคนมีภาวะ hypercholesterolemia ได้

Secondary hypercholesterolemia เกิดขึ้นได้จากสาเหตุของความผิดปกติอื่น ๆ เช่น hypothyroidism, nephrotic-syndrome, obstructive biliary disease, ยาเช่น ยาขับปัสสาวะ, glucocorticoids และ beta-blockers ดังนั้น ก่อนจะให้คำวินิจฉัยว่าเป็น primary hypercholesterolemia หรือ ให้การรักษาผู้ป่วยแพทย์จะต้องตัดภาวะที่อาจเกิดจาก secondary cause ออกก่อน

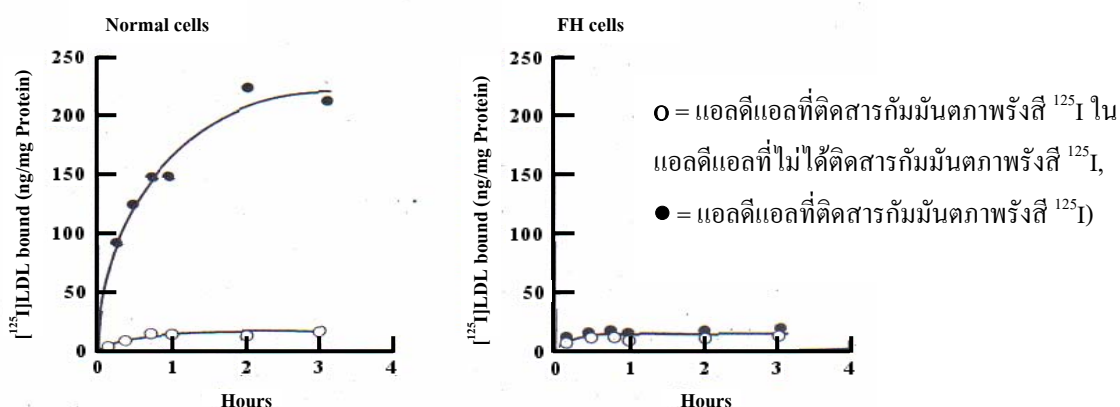


ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ของกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดในไทย

ที่มา: ฉายศรี (2546)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนตัวรับแอลดีแอลกับการเกิดโรค
familial hypercholesterolemia (FH)

ในปี ค.ศ. 1972 Michael Brown และ Joseph Goldstein ได้ทำศึกษาโรค FH ด้วยสมมติฐานที่ว่า การที่ร่างกายผลิตคอเลสเตอรอลที่มากเกินไปนั้นเกิดจากความผิดปกติของขบวนการควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล เมื่อเขาทำการศึกษาพบว่า การเพิ่มระดับแอลดีแอลในอาหารเลี้ยงเซลล์ของคนปกติจะไปยังยังการแสดงออกของ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็น rate limiting enzyme ที่ควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซลล์ ซึ่งต่างจากการเพิ่มระดับแอลดีแอลในอาหารเลี้ยงเซลล์ของคนที่เป็นโรค FH คือไม่มีผลต่อการแสดงออกของ HMG-CoA reductase ทำให้มีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลปริมาณสูงในเซลล์ human fibroblasts ของคนที่เป็นโรค FH เขาจึงสรุปว่า การที่มีการควบคุมการแสดงออกของ HMG-CoA reductase ที่ผิดปกติไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน HMG-CoA reductase แต่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ของคนที่เป็นโรค FH เอง ที่ไม่สามารถแยกคอเลสเตอรอลออกจากแอลดีแอลได้ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1974 เขาได้ทำการทดลองโดยใช้แอลดีแอลที่ติดสารกัมมันตภาพรังสี ^{125}I พบว่า ในเซลล์ของคนปกติมีการจับกันของแอลดีแอลที่ติดสารกัมมันตภาพรังสีกับตัวรับแอลดีแอลเพื่อนำเข้าเซลล์ ในขณะที่เซลล์ของคนโรค FH จะไม่มีการจับกันของแอลดีแอลที่ติดสารกัมมันตภาพรังสีกับตัวรับแอลดีแอล เขาจึงสรุปว่าเกิดจากความผิดปกติของตัวรับแอลดีแอลบนผิวเซลล์ จากนั้นเขาก็ได้ทำการศึกษาอย่างละเอียดเรื่องตัวรับแอลดีแอล ทำให้เขาเข้าใจขบวนการนำแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์โดยเอ็นโดไซโทซิส และเขาสามารถแบ่งการกลายพันธุ์ของยีนตัวรับแอลดีแอลได้เป็น 5 ประเภท (class) ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป (Cooper *et al.*, 2004)

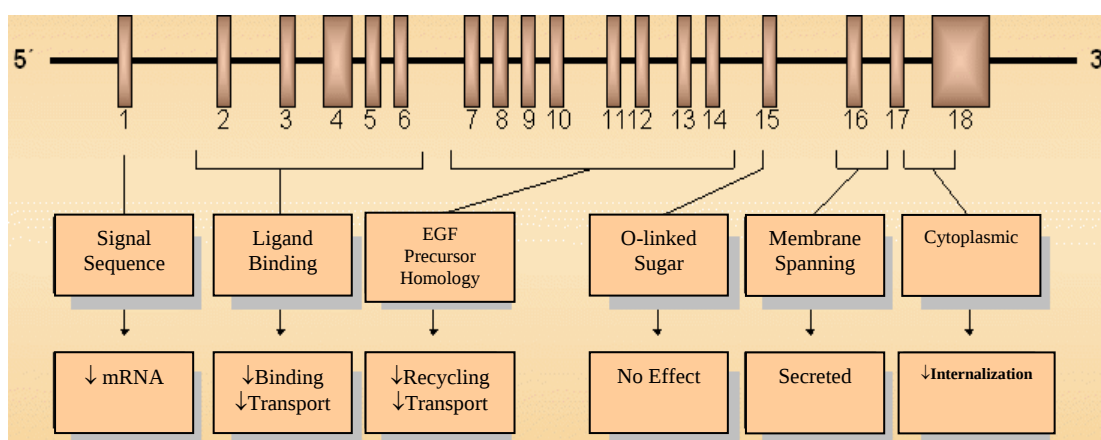


ภาพที่ 11 การจับกันของแอลดีแอลที่ติดสารกัมมันตภาพรังสีกับตัวรับที่ปกติบนผิวเซลล์ และตัวรับที่ผิดปกติบนผิวเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ

ที่มา: Cooper *et al.*, (2004)

ยีนตัวรับแอลดีแอลคอลลอเรสเตอรอล (Low Density Lipoprotein Receptor Gene, *LDLR*)

การเพิ่มขึ้นของระดับแอลดีแอลในเลือด ส่วนหนึ่งมักเกิดจากความผิดปกติของยีนตัวรับแอลดีแอลที่อยู่บนโครโมโซม (chromosome) 19 มีความยาว 45 กิโลเบส ประกอบด้วย 18 exons ดังภาพที่ 12 มีผลทำให้การสลายแอลดีแอลผิดปกติและสะสมอยู่ในกระแสเลือด (จีเรซ และคณะ, 2547) การกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลนี้ก่อให้เกิดโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบลักษณะเด่น (autosomal dominant, AD) ที่เรียกว่า familial hypercholesterolemia (FH) ทำให้เซลล์ไม่สามารถรับแอลดีแอลจากเลือดมาใช้ได้จึงทำให้แอลดีแอลในเลือดสูง (ลัดดา, 2547)

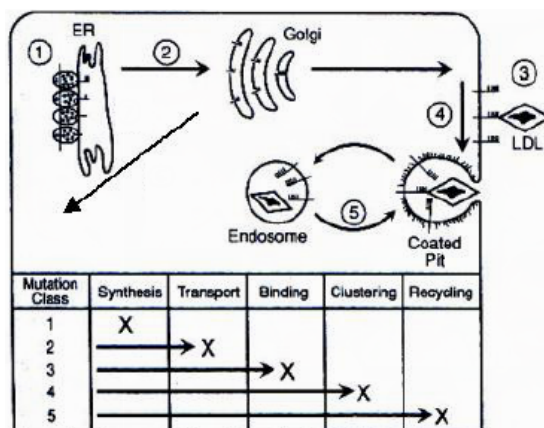
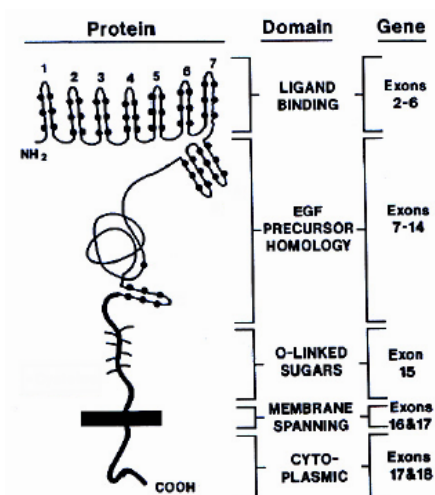
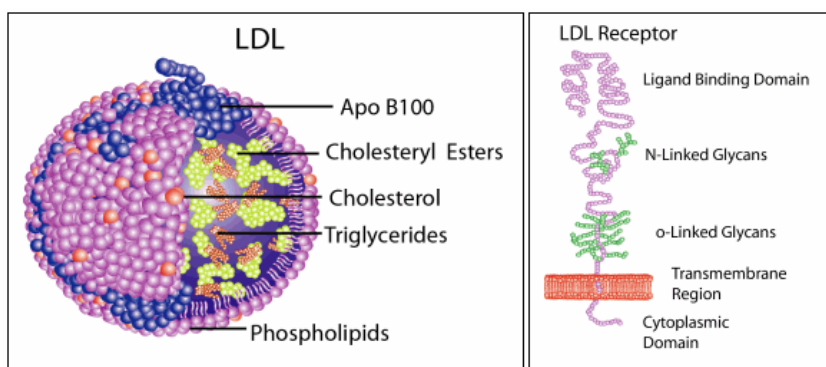


ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างของยีนตัวรับแอลดีแอลและหน้าที่ของแต่ละส่วน

ที่มา: นเรศร (2542)

ลักษณะทางคลินิกของโรคนี้พบระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (ค่าปกติคือน้อยกว่า 130 mg/dl) โดยพบคอเลสเตอรอล 300-600 mg/dl ในผู้ที่มีความผิดปกติแบบเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) พบว่ามีอุบัติการณ์ 1 ต่อ 500 คน มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจสูงเมื่ออายุ 30-40 ปี และ 600-1,000 mg/dl ในผู้ที่มีความผิดปกติแบบโฮโมไซกัส (homozygous) พบว่ามีอุบัติการณ์ 1 ต่อ 1,000,000 คน ซึ่งมี xanthoma ที่เป็นก้อนไขมันที่ผิวหนังและ atheroma ซึ่งเป็นก้อนไขมันที่เส้นเลือด (ภาพที่ 14) และมักจะเกิดโรคหัวใจขาดเลือดเมื่ออายุน้อยกว่า 20 ปี ผู้ป่วยที่เป็น heterozygote จะมีอาการน้อยกว่า homozygote (ลัดดา, 2547 ; Gelehrter and Collins, 1990 ; Thompson et al., 1991)

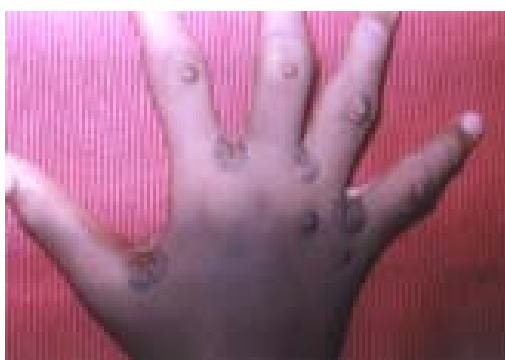
การกลายพันธุ์ของยีนตัวรับแอลดีแอลแบ่งออกได้เป็น 5 ประเภท (class) ต่อไปนี้ (ภาพที่ 13) ประเภทที่ 1 ซึ่งพบได้มากที่สุด ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ตัวรับแอลดีแอลเลย ประเภทที่ 2 ยังสร้างตัวรับแอลดีแอลได้ แต่ขั้นตอนแต่ง (process) ตัวรับแอลดีแอลใน golgi apparatus ผิดปกติ ทำให้ตัวรับแอลดีแอลไม่ถูกส่งไปที่ plasma membrane ประเภทที่ 3 สามารถสร้างตัวรับแอลดีแอลไปยังผิวเซลล์ได้แต่ไม่สามารถจับกับแอลดีแอลภายนอกเซลล์ได้ ประเภทที่ 4 สร้างตัวรับ แอลดีแอลที่สามารถจับแอลดีแอลแต่ไม่มีการรวมกลุ่มเป็นโค้ทพิท (coated pit) จึงไม่สามารถเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิสนำแอลดีแอลเข้าเซลล์ ประเภทที่ 5 สามารถจับ แอลดีแอลรวมกลุ่มเป็นโค้ทพิทเกิดกระบวนการเอนโดไซโทซิส ได้แต่ไม่สามารถนำตัวรับ แอลดีแอลกลับมาใช้ที่ผิวเซลล์ใหม่ได้ (Goldstein *et al.*, 2001)



ภาพที่ 13 การจำแนกการกลายพันธุ์บนยีนตัวรับแอลดีแอล

ที่มา: Goldstein *et al.* (2001)

การศึกษาในผู้ป่วยที่มีโรคหลอดเลือดแข็งและมีระดับแอลดีแอลสูง การให้ยาจะสามารถควบคุมให้ระดับแอลดีแอลลดลงสู่ระดับปกติ และลดความหนาของผนังหลอดเลือด (atheroma) ลงได้โดยทั่วไประดับปกติของแอลดีแอลในเลือดไม่ควรเกิน 130 mg/dl (Voet *et al.*, 1995) ในผู้ป่วยที่เป็นเฮเทอโรไซกัสสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดได้โดยการให้ยาชนิด bile acid-reducing resin (cholestyramine) เพื่อลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้ และให้ยาชนิด HMG-CoA reductase inhibitor (lovastatin) เพื่อลดการสร้าง endogenous cholesterol ซึ่งทำให้คอเลสเตอรอลในเซลล์ลดลง และมีผลทำให้เซลล์สร้างตัวรับแอลดีแอลเพิ่มขึ้นจึงทำให้แอลดีแอลสามารถถูกนำเข้าสู่เซลล์มากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลงด้วย แต่ผู้ป่วยที่เป็นชนิดโฮโมไซกัสจะไม่ตอบสนองต่อยา เพราะไม่สามารถสร้างตัวรับแอลดีแอลจะเห็นว่าการรักษาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นการรักษาเพื่อลดระดับแอลดีแอลและคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดเท่านั้น แต่ไม่ได้รักษาที่ต้นเหตุของการเกิดโรคคือที่ยีน ได้มีการศึกษาการรักษาในระดับยีนของโรคนี้โดยการนำ hepatocyte มาเพาะเลี้ยงแล้วใส่ยีนตัวรับแอลดีแอลที่มีตัวพาหะเป็น retroviral vector เมื่อเพาะเลี้ยงได้จำนวนเพียงพอแล้วจึงนำไปฉีดกลับเข้าไปในผู้ป่วยทาง portal vein เพื่อให้เข้าไปอยู่ในตับในการทำหน้าที่สร้างตัวรับแอลดีแอล (Cohn and Roth, 1996) พบว่าผลการรักษายังไม่ค่อยได้ผล ซึ่งยังต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป



ภาพที่ 14 ลักษณะอาการ xanthoma
ที่มา: Lindberg (2007)

การรักษาภาวะไขมันในเลือดสูง

ประกอบด้วยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำเนินชีวิตและการใช้ยาลดระดับไขมัน การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำเนินชีวิต หมายถึงการกำจัดปัจจัยเสี่ยงที่เกิดจากการดำเนินชีวิตประจำวันได้แก่ การสูบบุหรี่ การนั่งการยืนอยู่กับที่เป็นส่วนใหญ่ในแต่ละวันและความเครียด ร่วมกับการเพิ่มการออกกำลังกายและการรับประทานอาหารอย่างถูกต้อง (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)

การรักษาภาวะไขมันในเลือดสูงโดยการเปลี่ยนพฤติกรรม

1. การงดสูบบุหรี่ การสูบบุหรี่ ทำให้ระดับเอชดีแอลลดลง และทำให้ผนังหลอดเลือดแข็งตัว การสูบบุหรี่จึงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด เมื่อหยุดสูบบุหรี่จะทำให้ปัจจัยเสี่ยงลดลง

2. การออกกำลังกาย อย่างสม่ำเสมอและเพียงพอทำให้ระดับไตรกรีเซอไรด์และระดับเอชดีแอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการสำคัญในการลดและควบคุมน้ำหนัก ข้อพึงปฏิบัติสำหรับการออกกำลังกายที่สำคัญ คือ เริ่มออกกำลังกายแต่น้อย ๆ และค่อย ๆ เพิ่มขึ้น การออกกำลังกายที่ถูกต้องประกอบด้วย มีความสม่ำเสมอคือทุกวันหรือวันเว้นวันหรือวันเว้นวัน หรืออย่างน้อยสัปดาห์ละ 3 ครั้ง ระยะเวลาออกกำลังกายนายเพียงพอคือครั้งละ 30-45 นาที ความหนักของการออกกำลังกายพอเหมาะซึ่งในทางปฏิบัติใช้อัตราเต้นของหัวใจเป็นเกณฑ์ โดยออกกำลังกายให้ได้ อัตราเต้นหัวใจร้อยละ 60-85 ของอัตราเต้นของหัวใจสูงสุด อัตราเต้นของหัวใจสูงสุดได้จากการคำนวณโดยลบอายุเป็นปีออกจาก 220

3. การรับประทานอาหารที่ถูกต้อง คือ การรับประทานอาหารที่มีพลังงานพอเหมาะ และมีอาหารหลักครบทุกหมู่ โดยมีสัดส่วนและปริมาณคลอเลสเตอรอลที่เหมาะสมตามหลักการคือ (ภาพที่ 15)

3.1 ปริมาณอาหารหรือพลังงานต่อวันพอเหมาะ ทำให้น้ำหนักตัวอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

3.2 ปริมาณไขมันต่อวันให้พลังงานร้อยละ 25-35 ของพลังงานทั้งหมดโดยต้องคำนึงถึงประเภทของไขมันที่ใช้คือ

- ให้เป็นกรดไขมันอิ่มตัวไม่เกินร้อยละ 7 ของพลังงานทั้งหมด กรดไขมันอิ่มตัวพบได้มากในไขมันและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว และกะทิ

- เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง ไม่เกินร้อยละ 10 กรดไขมันเหล่านี้พบได้ในน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพดและพืชตระกูลถั่ว

- ที่เหลือเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่งเช่น กรดไลโนเลอิกที่พบมากในน้ำมันมะกอก

ดังนั้นควรปรุงอาหารด้วยน้ำมันพืชที่สกัดจากถั่วเหลือง ข้าวโพด เมล็ดดอกทานตะวัน หรือเมล็ดดอกคำฝอย รำข้าว มะกอก นอกจากนี้ ต้องหลีกเลี่ยงอาหารที่ปรุงด้วยการทอด รวมทั้งหลีกเลี่ยงการใช้ไขมันที่ได้รับการแปรรูปให้แข็งเช่น เนยเทียม เนยขาว โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ทำจากน้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวมากเช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม การรับประทานไขมันเหล่านี้จะทำให้ระดับแอลดีแอลคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น

3.3 ปริมาณโปรตีน ให้พลังงานร้อยละ 12-15 ของพลังงานทั้งหมด อาหารประเภทโปรตีนได้แก่ เนื้อสัตว์และถั่วในการรับประทานเนื้อสัตว์ยึดหลักดังนี้

- งดเครื่องในสัตว์และหนังสัตว์ทุกชนิดไม่ว่าจะปรุงรูปแบบใด

- อาหารที่มีไขมันปนควรหลีกเลี่ยงหรือรับประทานเล็กน้อยเป็นครั้งคราว ได้แก่ อาหารทะเล เช่น กุ้ง ปู ปลาหมึก เนื้อสัตว์ติดมันและหนัง ไข่แดงและเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ไส้กรอกทุกชนิด หมูแฮม แหนม หมูยอ กุนเชียง

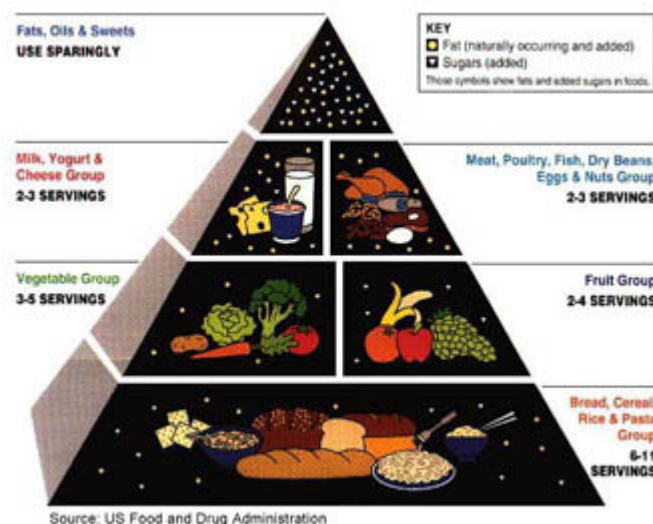
- อาหารที่รับประทานได้ประจำได้แก่ เนื้อปลาทุกชนิด ไก่ เป็ด หมู เนื้อที่ไม่ติดหนังและมัน

3.4 มีคอเลสเตอรอลไม่เกิน 200-300 mg ในหนึ่งวัน ขึ้นกับความรุนแรงของโรคและระดับไขมันในเลือด คอเลสเตอรอลมีเฉพาะในอาหารที่มาจากสัตว์เท่านั้นและมีมากในสมองสัตว์ เครื่องในสัตว์ชนิดต่าง ๆ และไข่แดงทุกชนิด จึงควรหลีกเลี่ยงรับประทานอาหารเหล่านี้ เนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ 100 g มีโคเลสเตอรอลอยู่ประมาณ 50-150 mg จึงรับประทานได้พอสมควร

3.5 พลังงานที่เหลือประมาณร้อยละ 55-65 ของพลังงานทั้งหมด ได้จากคาร์โบไฮเดรต คืออาหารประเภทแป้ง ซึ่งควรเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน ได้แก่ ธัญพืชหรือข้าว ถั่วชนิดต่าง ๆ เนื่องจากจะให้ทั้งใยอาหารและโปรตีน ควรหลีกเลี่ยงการใช้น้ำตาลหรืออาหารที่มีน้ำตาลสูงปริมาณสูง

3.6 รับประทานผักปริมาณมากและผลไม้ทุกมื้อเพื่อให้ได้ใยอาหารมากพอ

3.7 ดื่มน้ำแอลกอฮอล์ได้บ้าง ไม่ควรเกิน 6 ส่วนต่อสัปดาห์ (แอลกอฮอล์ 1 ส่วน ได้แก่ วิสกี้ 1 ½ ออนซ์ หรือเบียร์ 12 ออนซ์ หรือไวน์ 4 ออนซ์) ยกเว้นผู้ที่มึ่ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงห้ามดื่มน้ำแอลกอฮอล์ (วีรพันธุ์, 2549 ; สุนทราภรณ์, 2549)



ภาพที่ 15 ปีรามิดอาหาร

ที่มา: US Food and Drug Administration (2007)

การรักษาภาวะไขมันในเลือดสูงโดยการใช้ยา

แม้การเปลี่ยนพฤติกรรมบางอย่าง เช่น การควบคุมอาหาร งดสูบบุหรี่ และออกกำลังกายอย่างเหมาะสม จะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้มีสุขภาพดีขึ้นและช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจแต่การควบคุมอาหารและการออกกำลังกายนั้น อาจจะไม่เพียงพอ ดังนั้นแพทย์จะเป็นผู้พิจารณาใช้ยาลดไขมันเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

การได้รับยาที่ถูกต้องโดยคำสั่งของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจึงมีความสำคัญมากในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลเพื่อลดระดับแอลดีแอลในเลือดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มีอาการของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่จำเป็นต้องลดแอลดีแอลให้อยู่ในระดับต่ำกว่าปกติและในคนทั่วไป การที่มีแอลดีแอลต่ำก็จะช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจได้ด้วย ยาลดคอเลสเตอรอลในปัจจุบัน มีอยู่หลายชนิด การเลือกใช้ควรปรึกษาแพทย์ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับแอลดีแอลที่ควรพิจารณาให้ยาในผู้ป่วยที่มีระดับความเสี่ยงระดับต่าง ๆ

ระดับความเสี่ยง	ระดับแอลดีแอลที่ควรพิจารณาให้ยา (mg/dl)	ระดับแอลดีแอลเป้าหมาย (mg/dl)
1. CHD และ CHD risk equivalent	มากกว่า/เท่ากับ 130	น้อยกว่า 100
2. risk factor ตั้งแต่ 2 ข้อขึ้นไป		
2.1 ความเสี่ยง 10 ปี ระหว่างร้อยละ 10-20	มากกว่า/เท่ากับ 130	น้อยกว่า 130
2.2 ความเสี่ยง 10 ปี ไม่ถึงร้อยละ 10	มากกว่า/เท่ากับ 160	น้อยกว่า 130
3. risk factor ไม่เกิน 1 ข้อ	มากกว่า/เท่ากับ 190	น้อยกว่า 160

ที่มา: (อภิชาติ และคณะ, 2546)

สแตตินส์ (Statins) ยาในกลุ่มสแตตินส์เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการช่วยลดแอลดีแอลได้ประมาณ 25-50% โดยจะช่วยในการทำงานของตับในการกำจัดแอลดีแอลที่อยู่ในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังสามารถลดไตรกลีเซอไรด์ได้ 10-20% และเพิ่มเอชดีแอลได้ 2-10%

Bile Acid Resins เมื่อ bile acid resins รวมกับ cholesterol-containing bile ในลำไส้แล้วจะขับออกมากับอุจจาระ ตัวยานี้จะช่วยลดปริมาณแอลดีแอลประมาณ 10-20%

Nicotinic Acid มีให้เลือก 2 ชนิด: immediate release and timed release และ nicotinic acid (หรือ niacin) ช่วยในการลดระดับแอลดีแอล นอกจากนี้ยังมียาชนิดอื่น ๆ ที่แพทย์นิยมใช้สำหรับผู้ป่วยที่มีปริมาณไขมันในเลือดสูงได้แก่ ยาในกลุ่มไฟเบรท (Fibrates)

กลุ่มผู้ป่วยที่แอลดีแอลสูงมาก (ตั้งแต่ 190 mg/dl ขึ้นไป) มักจะถูกถ่ายทอดมาทางกรรมพันธุ์ การรักษาอาจต้องใช้ statin ร่วมกับ bile acid sequestrant เนื่องจากว่าจะเสริมฤทธิ์กันและมีความปลอดภัยสูง

ข้อควรจำในการใช้ยาอย่างถูกวิธี 1) สิ่งสำคัญในการใช้ยาลดคอเลสเตอรอล คือต้องปฏิบัติตามคำสั่งแพทย์อย่างเคร่งครัด 2) รับประทานยาให้ตรงเวลาและสม่ำเสมอ ตามคำสั่งแพทย์ 3) เก็บยาไว้ในที่ที่เห็นได้ง่าย 4) ไม่ควรรับประทานยาขาดหรือเกินขนาดที่กำหนดไว้ 5) ไม่ควรหยุดรับประทานยาเองแม้อาการจะดีขึ้นควรให้แพทย์เป็นผู้สั่งเท่านั้น 6) ควรบอกแพทย์ที่ทำการรักษาถึงประวัติรับประทานยาและการแพ้ยา 7) เก็บยาไว้ในที่ปลอดภัย ห่างจากมือเด็ก (อภิชาติ และคณะ, 2546)

การควบคุมระดับไขมันในเลือดและการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ

การควบคุมระดับไขมันในเลือด

เมื่อตรวจพบว่าระดับคอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol) ในเลือดสูง ควรตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมว่ามีระดับแอลดีแอลหรือเอชดีแอลเท่าไร ถ้าระดับแอลดีแอลสูง ควรพยายามลดระดับแอลดีแอลดังนี้

1. การควบคุมอาหาร

1.1 หลีกเลี่ยงอาหารพวกไข่แดง เครื่องในสัตว์ เนื้อสัตว์ส่วนที่ติดมันทุกชนิด สมอ สัตว์ อาหารทะเลบางชนิด เช่น หอยนางรม ปลาหมึก

1.2 หลีกเลี่ยงอาหารที่ปรุงด้วยน้ำมัน อาหารทอด เจียว ควรใช้น้ำมันพืชแทนน้ำมันสัตว์ เช่น เนย หรือ น้ำมันหมู น้ำมันพืชที่สกัดจากเมล็ดพืชจะมีกรด linoleic acid ที่เป็นตัวนำคอเลสเตอรอลไปเผาผลาญได้ดี

1.3 ควรหลีกเลี่ยงน้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูง เช่น น้ำมันมะพร้าว หรือ กะทิ

1.4 ควรดื่มนมพร่องมันเนยแทนนมที่มีไขมันเต็มส่วน

1.5 พยายามเปลี่ยนแปลงการปรุงอาหารเป็น นึ่ง ต้ม ย่าง อบ แทนการทอดหรือผัด

1.6 พยายามลดน้ำหนักตัวในกรณีที่มีน้ำหนักเกิน

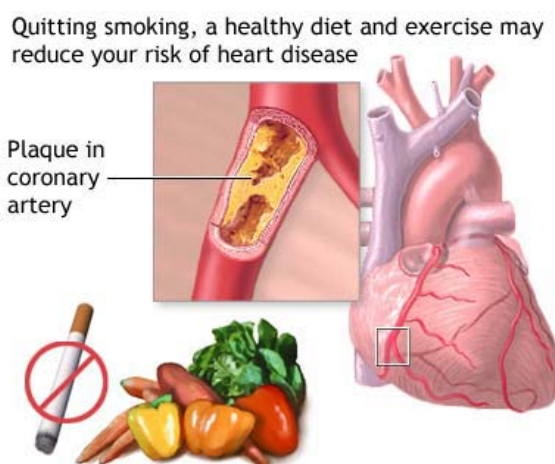
1.7 ควรเพิ่มอาหารพวกผักใบต่าง ๆ และผลไม้บางชนิดที่มีกากใย เช่น ผักคะน้า ผักกาดฝรั่ง ส้ม ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายดูดซึมไขมันน้อยลง

2. การออกกำลังกายจะทำให้ระดับแอลดีแอลในเลือดลดลง ขณะเดียวกันระดับเอชดีแอลจะสูงขึ้นมีผลทำให้หลอดเลือดแดงจะเสื่อมช้าลงและป้องกันการอุดตันอย่างเฉียบพลันได้ด้วย

3. การใช้ยาลดระดับไขมันในเลือดควรอยู่ในดุลยพินิจของแพทย์เท่านั้น ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจหรือโรคหลอดเลือดสมองตีบ เพราะจำเป็นต้องตรวจเช็คร่างกายสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันผลแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้ยา (Committee on Diet and Health, 1989)

การป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ

เพื่อหลีกเลี่ยงให้ห่างจากโรคหลอดเลือดหัวใจควรหยุดสูบบุหรี่ ควบคุมอาหารที่มีคลอเรสเตอรอลและไขมันอิ่มตัวสูง ควบคุมน้ำหนักตัวให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ออกกำลังกายสม่ำเสมอ สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง และตรวจร่างกาย เพื่อวัดความดันโลหิต ตรวจเลือดหาโรคเบาหวาน เพื่อการป้องกันและรักษาต่อไป (ภาพที่ 16) (Committee on Diet and Health, 1989)



ภาพที่ 16 Prevention of heart disease

ที่มา: Lindberg (2007)

การประยุกต์ใช้อณูพันธุศาสตร์ทางคลินิก

การพัฒนาเทคโนโลยี การค้นพบยีนและการค้นพบองค์ความรู้ใหม่ทางพันธุศาสตร์มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิก ทั้งการวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วย ในปัจจุบัน ประโยชน์ที่เกิดขึ้นอย่างแท้จริงคือการวินิจฉัย อย่างไรก็ตาม ความเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาการรักษา ทั้งการผลิตยาหรือแม้แต่การทำ gene therapy ก็มีความเป็นไปได้อย่างมากในอนาคต

การวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการแพทย์ได้ถึง 3 แขนง คือ เวชพันธุศาสตร์ นิติเวชศาสตร์ และวินิจฉัยมะเร็ง การประยุกต์ใช้ทางเวชพันธุศาสตร์ คือการนำไปช่วยในการวินิจฉัย โดยเฉพาะการทำการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) ก่อนเกิดอาการ (presymptomatic diagnosis) ยืนยันการวินิจฉัยโรคการศึกษากายพาหะ (carrier testing) และการทำ genetic screening (นเรศวร, 2542)

การประยุกต์ใช้วินิจฉัยในทางคลินิก

การประยุกต์ใช้วินิจฉัยในทางคลินิกโดยเฉพาะโรคที่ถ่ายทอดแบบยีนเดี่ยว สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือการวินิจฉัย และการสืบหา (screening) การวินิจฉัยทางพันธุกรรมสามารถนำมาใช้ได้ 4 กรณีคือ

1. ยืนยันการวินิจฉัยโรค โดยการตรวจดีเอ็นเอเป็นวัตถุประสงค์รอง และมีความจำเป็นค่อนข้างน้อยเพราะการตรวจทางคลินิกโดยทั่วไป มักจะสามารถใช้การวินิจฉัยแก่ผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตาม ก็ดีการพบการกลายพันธุ์ของยีนที่สงสัยก็เป็นข้อยืนยันถึง การวินิจฉัยได้อย่างดี

2. การวินิจฉัยก่อนเกิดอาการ มีความสำคัญในบางโรค เพราะการรู้การวินิจฉัยก่อนเกิดอาการจะช่วยให้การดูแลรักษาป้องกันการเกิดโรคได้ อย่างไรก็ตาม ก็ดีการตรวจก่อนเกิดอาการก็อาจจะเป็นโทษได้ในบางกรณี โดยอาจเป็นการเพิ่มความทุกข์ และความกังวลแก่ผู้ที่มียีนที่กลายพันธุ์แต่ยังไม่แสดงอาการโดยไม่มีวิธีป้องกันอาการที่จะเกิดขึ้น

3. การวินิจฉัยภาวะพาหะ เป็นสิ่งจำเป็นในกรณีที่สมาชิกในครอบครัวต้องการรู้ว่าตนเองนั้น ได้รับยีนที่ผิดปกติมาและจะมีผลทำให้มีโอกาสที่บุตรของตนมีความผิดปกติเกิดขึ้นหรือไม่เพื่อ

จะได้ทำการป้องกันต่อไป ในกรณีที่โรคนั้น ๆ เป็นโรคที่พบบ่อย การสืบหาพาหะในชุมชนอาจเป็น สิ่งจำเป็นเมื่อสืบหาแล้ว ก็ควรจะพิสูจน์บุคคลนั้น ๆ ด้วยการวินิจฉัยต่อไป

4. การวินิจฉัยก่อนคลอด คู่สามีภรรยาที่กำลังจะมีบุตรทุกรายจะมีความปรารถนาที่จะมี บุตรที่มีสุขภาพสมบูรณ์และแข็งแรง และทุกคู่ก็มักจะมีความกังวลว่าบุตรของตนอาจจะมี ความพิการ เกิดขึ้น ถ้าคู่สามีภรรยาที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางพันธุกรรมสูงและทราบดีถึงความทุกข์ (burden) ที่เกิดขึ้นจากความพิการนั้นก็จะยังมีความกังวลและต้องการทราบว่าบุตรในครรภ์นั้น มี ความพิการนั้นหรือไม่วัตถุประสงค์หลักของการวินิจฉัยก่อนคลอดคือการวินิจฉัยทารก (embryo or fetus) ในครรภ์เพื่อให้ข้อมูลแก่คู่สามีภรรยา ซึ่งโดยทั่วไปความเสี่ยงที่จะมีความพิการจะน้อยกว่า โอกาสที่จะปกติ ดังนั้นการวินิจฉัยก่อนคลอดจึงมีวัตถุประสงค์หลักที่จะตรวจสอบยืนยันว่าเด็กในท้อง ปกติเพื่อระงับความกังวลมากกว่าที่จะตรวจเพื่อที่จะหาว่าเด็กผิดปกติจริงหรือไม่ อย่างไรก็ตาม ถ้าพบว่าเด็ก (embryo หรือ fetus) ผิดปกติพ่อแม่ก็สามารถมีข้อมูลที่จะตัดสินใจในอนาคต ถ้ายอมรับ burden ที่เกิดจากความพิการนั้น ๆ ได้ ก็จะมีความพร้อมที่จะเลี้ยงดูบุตรที่พิการให้มี พัฒนาการที่ดีกว่าพ่อแม่ ที่ไม่พร้อมทั้งร่างกายและจิตใจ แต่ถ้า burden หรือความทุกข์ที่จะเกิดจาก ความพิการนั้นมีต่อครอบครัวมากและรุนแรง คู่สามีภรรยาก็สามารถที่จะตัดสินใจทำแท้งได้ใน ประเทศที่การทำแท้งยอมรับและถูกกฎหมาย (นเรศร, 2542)

การวินิจฉัยทางอนุพันธุศาสตร์ในผู้ป่วยโรคพันธุกรรม

วิธีการวินิจฉัยทางอนุพันธุศาสตร์ในผู้ป่วยโรคพันธุกรรมโดยเฉพาะแบบยีนเดี่ยวคือ การศึกษาหาฮีนที่กลายพันธุ์ หรือ โครโมโซมที่มีฮีนที่กลายพันธุ์ ว่าปรากฏอยู่ที่ผู้ใดในสมาชิก ครอบครัว โดยสามารถศึกษาได้ทั้งวิธี direct mutation analysis หรือการสืบหาการกลายพันธุ์ โดยตรงซึ่งจะใช้วิธีหนึ่งคือ linkage analysis เป็นวิธีสืบหาโครโมโซมที่มีฮีนที่การกลายพันธุ์ว่า โครโมโซมนั้น ๆ ไปอยู่ที่ผู้ที่ถูกตรวจหรือไม่ วิธีการ linkage analysis นี้ประโยชน์ในกรณีที่ ไม่สามารถตรวจแบบ direct mutation analysis ได้ นิยมใช้ RFLP หรือ microsatellite ซึ่งเป็น polymorphic marker ที่อยู่ใกล้กับฮีนที่ศึกษาโดยนิยมใช้ marker ที่อยู่ 5' และ 3' ของฮีนคู่กันถ้ามี marker ที่อยู่ในฮีนก็ยิ่งดี ข้อเสียของการทำวิธีนี้ คือความน่าเชื่อถือน้อยกว่า 100% เสมอ ขึ้นกับ โอกาสที่จะพบ recombination ระหว่าง mutation กับ marker ที่ศึกษา

Screening ในทางการแพทย์คือการตรวจหาผู้ป่วยในระยะแรกเพื่อให้การดูแลรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ การตรวจ screening จำเป็นจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายน้อย ใช้กับคนจำนวนมากได้ และควรคำนึงถึงความไวและความจำเพาะ (sensitivity and specificity) ของการตรวจนั้น ๆ ด้วย นอกจากนี้สิ่งที่จะต้องระวังคือ screening test ไม่ใช่การวินิจฉัยโรคเพราะในการตรวจ screening บางอย่าง ผลการตรวจที่ได้ อาจมี false positive และ negative ได้ ดังนั้น การตรวจ screening จึงเป็นวิธีการคัดเลือก เพื่อนำผู้ป่วยมาตรวจละเอียดสำหรับการวินิจฉัยโรคอีกที ในทางเวชพันธุศาสตร์ มีการทำ genetic screening สำหรับ 3 กรณีคือ

1. การตรวจหาทารกแรกเกิด (newborn screening) การทำการวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อตรวจวินิจฉัยทางพันธุกรรมสามารถทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อของ embryo หรือ fetus มาตรวจ โดยใช้ข้อบ่งชี้ดังต่อไปนี้ 1) Advanced maternal age, 2) Chromosome abnormality, 3) Neural tube defect, 4) Inborn error of metabolism, 5) Disease detectable by DNA analysis ซึ่งวิธีการในปัจจุบันมีได้ 5 วิธี คือ

- *Amniocentesis* คือการเจาะดูดน้ำคร่ำนิยามทำในช่วง 14-17 สัปดาห์ โดยดูดน้ำคร่ำประมาณ 15-20 ซีซี วิธีการนี้จะใช้เครื่องตรวจคลื่นเสียงความถี่เป็นตัวนำเพื่อทราบตำแหน่งของเด็ก น้ำคร่ำและเข็มที่อยู่ น้ำคร่ำที่ได้ประกอบด้วยน้ำคร่ำและเซลล์ผิวหนังของทารกที่หลุดลอกออก ซึ่งตัวน้ำคร่ำสามารถนำไปตรวจทางชีวเคมีบางอย่าง เช่น ตรวจหา alpha-fetoprotein ซึ่งถ้าสูงก็จะเป็นข้อบ่งชี้ของโรค neural tube defect ส่วนตัวเซลล์สามารถนำไปตรวจทางพันธุกรรม เช่น ตรวจโครโมโซม หรือตรวจดีเอ็นเอได้ ในปัจจุบันข้อบ่งชี้ที่พบบ่อยที่สุดในการตรวจ amniocentesis ก็คือการตรวจโครโมโซมของ fetus ในแม่ที่อายุมาก (มากกว่า 35 ปี) เพราะในแม่ที่อายุมากจะมีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรค Down syndrome สูง การทำ amniocentesis เป็นวิธีการทางการแพทย์ที่มีความปลอดภัยสูง พบมีความผิดปกติจากการทำ amniocentesis ได้น้อยกว่า 0.5% ความผิดปกติเหล่านี้ได้แก่ การติดเชื้อและ injury ของ fetus และแม่ ซึ่งพบว่าในสถาบันที่มีประสบการณ์และได้มาตรฐานพบว่าตัวเลขที่พบจะยิ่งน้อยกว่า 0.5% มาก ๆ และไม่นับสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยวิธี amniocentesis สำหรับตรวจดีเอ็นเอ และโครโมโซม จึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยและให้คำตอบที่ถูกต้องแน่นอน

- *Chorionic villus sampling (CVS)* เป็นการตัดเอารกไปตรวจโดยสามารถทำได้โดยใช้เข็มเจาะผ่านทางปากมดลูก (transcervical) หรือ ผ่านทางหน้าท้อง (transabdominal) CVS สามารถทำได้ในช่วงอายุครรภ์ 8-12 สัปดาห์ (นิยามทำช่วง 10-12 สัปดาห์เพราะมี complication น้อยกว่า) ทำให้

CVS มีข้อดีกว่า amniocentesis คือสามารถทำได้ในระยะอายุครรภ์น้อยกว่าทำให้ทราบผลเร็วกว่า ซึ่งเป็นผลดีในการร่นระยะเวลาวิตกกังวลของสามีและภรรยา และถ้าต้องทำแท้งก็สามารถทำได้ในอายุครรภ์ที่น้อยกว่าทำให้ทราบผลเร็วกว่า ซึ่งเป็นผลดีในการร่นระยะเวลาวิตกกังวลของสามีภรรยา และถ้าต้องการทำแท้งก็สามารถทำได้ในระยะเวลาที่อายุครรภ์ไม่สูงเกินไป ข้อดีอีกข้อของ CVS คือสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณมากกว่า amniocentesis ทำให้เหมาะสมกว่าในการตรวจทางดีเอ็นเอของโรคบางชนิดที่อาจต้องใช้ดีเอ็นเอมาก ข้อเสียของ CVS คือโอกาสเกิด complication สูง เช่นพบมี fetal loss ได้สูงถึง 3-5% นอกจากนี้ พบมีรายงานว่าจะทำให้เกิด แขนขา ผิดปกติได้ถ้าทำ CVS ในระยะ 8-9 สัปดาห์ นอกจากนี้การตรวจ CVS จะไม่สามารถตรวจทางชีวเคมีได้ เพราะฉะนั้นการเลือกทำ CVS หรือ amniocentesis ควรจะขึ้นกับข้อบ่งชี้ความชำนาญของแพทย์ วิธีการตรวจในห้องปฏิบัติการ และความต้องการของคู่สามีภรรยา

- *Cordocentesis* เป็นวิธีการเจาะเลือดของ fetus จาก umbilical cord ซึ่งมักทำในระยะท้าย ๆ และเกิด complication สูงกว่า CVS

- *Preimplantation diagnosis* เป็นเทคโนโลยีสมัยที่สามารถดูเอาเซลล์เพียง 1-2 เซลล์ จากตัวอ่อนในระยะแรก ๆ (ประมาณ 8 เซลล์) และนำไปตรวจหาความผิดปกติถ้าไม่พบความผิดปกติก็สามารถนำ ตัวอ่อนนั้น ๆ ยังกลับเข้าไปในแม่ได้

- *Fetal cells in maternal blood* เป็นการใช้เทคโนโลยี เพื่อคัดเลือกเซลล์ของ fetus ที่หลุดมาในเลือดแม่ ขณะตั้งครรภ์เพื่อนำมาตรวจทางพันธุกรรม เพื่อหลีกเลี่ยง complication ที่อาจเกิดขึ้นจาก amniocentesis และ CVS Preimplantation diagnosis และ diagnosis of fetal cells in maternal blood เป็นการก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอย่างหนึ่งในการวินิจฉัยก่อนคลอด อย่างไรก็ตามทั้งวิธีนี้ยังอยู่ในการทดลองและยังไม่ได้ถูกนำมาใช้ในงานบริการ

2. การตรวจหาพาหะ (*screening for carrier of genetic diseases*) การสืบหาพาหะของโรคทางพันธุกรรมในชุมชนมีประโยชน์เพื่อให้สามารถตรวจพบผู้ที่เป็นพาหะ โดยมีประวัติครอบครัวต่อนักถึง burden ที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากโรคพันธุกรรมนั้น ๆ การพิจารณาว่าการตรวจหาพาหะจะคุ้มค่า (cost effective) หรือไม่ควรจะพิจารณาถึง 1) โรคทางพันธุกรรมนั้น ๆ มีความรุนแรงหรือทำให้เกิดความทุกข์ (burden) มาก 2) ควรจะทำในชุมชนที่มีความเสี่ยงต่อโรคนั้น ๆ สูง หรือ มีอุบัติการณ์สูง 3) วิธีการตรวจจะต้องมีราคาถูกและมีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่เหมาะสม 4) จะต้องมียุทธวิธีวินิจฉัยจำเพาะ (definitive test) เพื่อให้ได้

การวินิจฉัยที่แน่นอน 5) จะต้องมีการเลือกโดยเฉพาะในการวางแผนครอบครัวเกี่ยวกับการมีบุตร (reproductive option) แก่ผู้ที่ถูกตรวจพบว่าเป็นพาหะ และ 6) การตรวจหาพาหะจะต้องทำด้วยความต้องการและสมัครใจของผู้ถูกตรวจ

3. การตรวจหาความถี่ของโรค (screening to determine the frequency and natural history of genetic disease) การตรวจหาความถี่ของโรคที่พบในชุมชนเป็นการตรวจ screening อย่างหนึ่ง ทั้งนี้การตรวจดังกล่าวอาจจะได้ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับ incidence ของยีนในลักษณะต่าง ๆ ในชุมชน (นเรศร, 2542)

การตรวจทางพันธุกรรม

การตรวจทางพันธุกรรม (genetic test) คือ การวิเคราะห์สาร ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ ยีน หรือ โครโมโซมของบุคคลแต่ละคนเพื่อตรวจค้นความผิดปกติที่ได้รับการถ่ายทอดมาทางพันธุกรรม หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) การตรวจทางพันธุกรรมเพื่อพยากรณ์ความเสี่ยงในการเกิดโรค ช่วยให้ผู้ที่ประวัติครอบครัวของโรคต่าง ๆ ที่มีปัจจัยทางพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องสามารถประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคของตนหรือผู้สืบสายเลือด และอาจสามารถดำเนินการเพื่อลดความเสี่ยงจากโรค เช่น ปรับแบบแผนการใช้ชีวิต หรือทำการตรวจสุขภาพโดยเฉพาะในเรื่องที่เกี่ยวกับโรคนั้น ๆ อย่างสม่ำเสมอ แต่การตรวจทางพันธุกรรมเพื่อพยากรณ์ความเสี่ยงในการเกิดโรคก็อาจก่อให้เกิดผลกระทบและมีประเด็นปัญหาต่าง ๆ ได้แก่

1. การเกิดโรคนั้น นอกจากมีสาเหตุมาจากความผิดปกติเชิงพันธุกรรมของผู้ป่วยแล้วยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น เพศ อายุ เชื้อชาติ สิ่งแวดล้อม การเลี้ยงดู เป็นต้น ซึ่งทำให้การพยากรณ์การเกิดโรคโดยการตรวจทางพันธุกรรมมีความซับซ้อนและไม่แม่นยำ 100% จึงไม่อาจเชื่อถือได้โดยสมบูรณ์

2. การขาดข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับแนวทางปฏิบัติเพื่อลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรค ในบางโรค นอกจากองค์ความรู้ที่มีในปัจจุบันยังไม่สามารถทำนายได้ว่าจะเกิดโรคขึ้นเมื่อใดและรุนแรงแค่ไหน แล้วยังไม่มีแนวทางป้องกันหรือลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคได้เลย ส่วนในบางโรคแม้จะมีแนวทางการป้องกันหรือปฏิบัติตนเพื่อลดความเสี่ยงหลายประการ แต่ก็ยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนว่าแต่ละวิธีนั้นได้ผลมากน้อยเพียงใด

3. จากที่กล่าวแล้วว่าการตรวจทางพันธุกรรมมีความซับซ้อนและสามารถพยากรณ์ความเสี่ยงในการเกิดโรคได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น ไม่สามารถบอกได้ว่าจะเกิดโรคได้จริงหรือไม่เกิดเมื่อไร จึงทำให้ผู้ที่ทราบผลการตรวจอาจมีความเครียด ความกังวล และอาจเกิดปัญหาเกี่ยวกับจิตใจและการใช้ชีวิตในสังคมได้ (ประสิทธิ์, 2549)

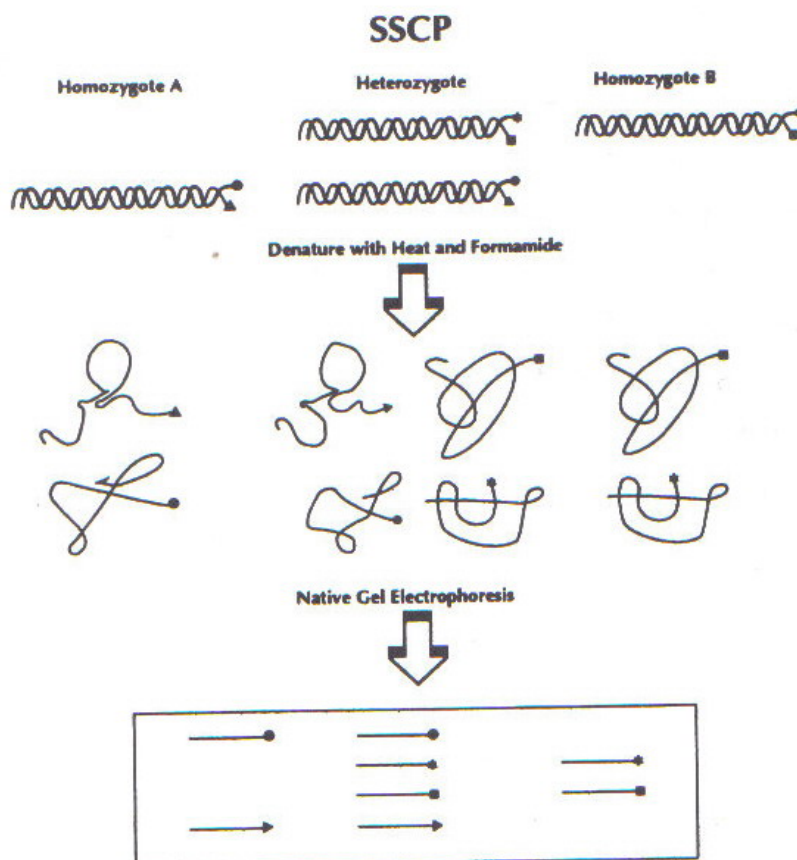
ประโยชน์ของการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ทำให้เกิดประโยชน์แก่มวลมนุษยชาติมากมาย ซึ่งอาจสรุปได้ใน 3 หัวข้อใหญ่ ๆ คือ 1) การพัฒนาเทคโนโลยีทางชีววิทยาและการแพทย์ 2) การพัฒนาความรู้ความเข้าใจต่อธรรมชาติของมนุษย์และโรคของมนุษย์ และ 3) การประยุกต์ใช้ทางคลินิก

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเป็นสิ่งที่สำคัญ เนื่องจากถ้าการกลายพันธุ์นั้นจำเพาะกับโรค ก็เป็นข้อสนับสนุนยืนยันว่ายีนนั้น ๆ เป็นยีนที่ก่อให้เกิดโรคนั้นจริง วิธีการสืบหาการกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบว่าจะจำเพาะอยู่บริเวณใด วิธีการเหล่านี้เรียกว่า mutation screening ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี เช่น southern blotting, single strand conformation polymorphism (SSCP), chemical cleavage of mismatches (CCM), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), protein truncation test, sequencing ฯลฯ การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของยีน และความเหมาะสมของวิธีการ สำหรับในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษายีนตัวรับแอลดีแอลซึ่งมีจำนวน exon ถึง 18 exon และ promoter อีก 1 ส่วน ซึ่งมีชิ้นส่วนจำนวนมาก และแต่ละชิ้นส่วนมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก จึงเหมาะกับการศึกษา mutation screening ในเบื้องต้นด้วยเทคนิค SSCP เนื่องจากราคาถูกกว่าวิธี sequencing ซึ่งจะละเอียดและแม่นยำกว่า ก่อนที่จะศึกษาด้วยวิธี sequencing ต่อไป (นเรศร, 2542)

Single strand conformational polymorphism (SSCP)

SSCP เป็นวิธีตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้นดีเอ็นเอนั้น (point mutation) เทคนิค SSCP อาศัยหลักที่ว่า ดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสของดีเอ็นเอสายนั้น หรือมีโครงสร้างที่จำเพาะ ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน nondenaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็

สามารถทำให้เกิดโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเร็วช้าแตกต่างกัน ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การตรวจพอลิมอร์ฟิซึมจากผลผลิตของพีซีอาร์ด้วยวิธี SSCP
ที่มา: สุรินทร์ (2545)

ความไวของการตรวจ SSCP ขึ้นกับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ เนื่องจากการตรวจหาความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันเพียง 1 เบส ดังนั้นถ้าสายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความยาวมากขึ้นเท่าใดความไวในการตรวจพบ SSCP ก็ยิ่งน้อยลง ขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาพอลิมอร์ฟิซึมด้วยวิธีนี้คือประมาณ 200 - 500 นิวคลีโอไทด์ สำหรับปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการตรวจสอบ เช่น ค่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ความเข้มข้นและสัดส่วนของเจล องค์ประกอบของเบส ตำแหน่งและชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลอง (สุรินทร์, 2545)

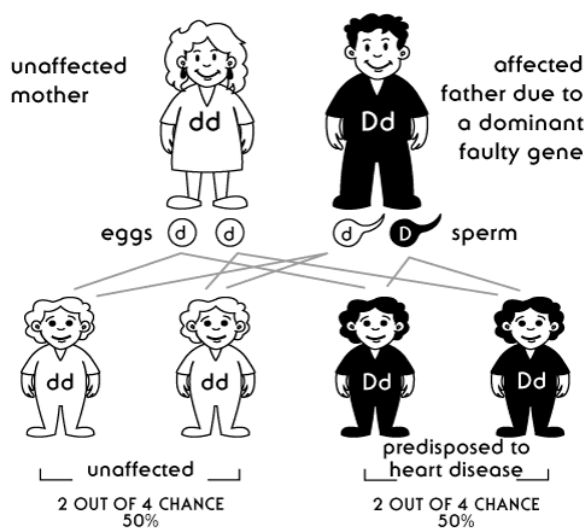
การให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์

การให้คำแนะนำปรึกษาแก่ผู้ป่วยทั่วไปที่มารับการรักษาในสถานพยาบาล จัดเป็นหน้าที่ที่สำคัญอย่างหนึ่งของแพทย์และบุคลากรที่เกี่ยวข้อง โดยปกติการให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วยจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้น สิ่งที่ยังใช้ได้คือการปฏิบัติตามของผู้ป่วยและครอบครัว สำหรับการให้ counseling นั้นมีความหมายที่มากกว่าการให้คำแนะนำทั่วไป (patient education หรือ health education) การให้ counseling หมายถึงการให้คำแนะนำปรึกษา และสามารถบ่งชี้ทางออกที่ผู้ป่วยหรือบุคคลที่เกี่ยวข้องโดยเฉพาะในครอบครัวของผู้มารับการรักษา

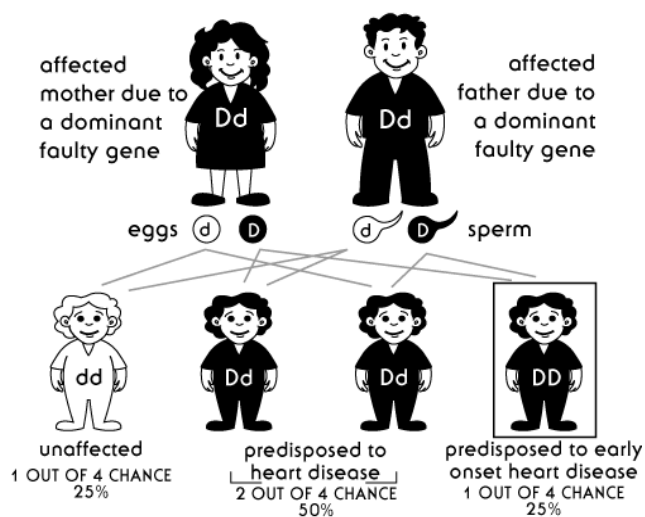
จากการศึกษาโรคพันธุกรรมในมนุษย์ที่มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็วทำให้เกิดความรู้ใหม่ ๆ และวิธีการที่จะประยุกต์ใช้กับโรคเหล่านี้อย่างกว้างขวางทั้งในด้านสืบค้นสาเหตุ การวินิจฉัย และการรักษา ดังนั้นความเข้าใจที่ถูกต้องและความร่วมมือที่ดีจากผู้ป่วย จึงมีมากขึ้นเช่นกัน

การให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling) ที่ผู้มาปรึกษาควรได้รับคือ ความจริงทางการแพทย์ซึ่งรวมทั้งการวินิจฉัยหาความผิดปกติของโรคที่เกิด อธิบายถึงลักษณะการถ่ายทอดความผิดปกติของโรค และความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นในญาติ ทำให้ผู้ป่วยและญาติเข้าใจวิธีการป้องกันความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้น อีกทั้งยังช่วยในการตัดสินใจ เลือกวิธีการแก้ไขปัญหอย่างเหมาะสมกับสภาพครอบครัวและสังคม รวมถึงเลือกวิธีการที่ดีที่สุดที่เป็นไปได้ในการแก้ไขปัญหาสำหรับบุคคลในครอบครัวที่เป็นโรคพันธุกรรม

การให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์นี้ไม่ได้เพียงมุ่งเน้นในการให้ข้อมูลทางการแพทย์และพันธุกรรมแต่ต้องการมุ่งเน้นสนับสนุนให้ครอบครัวสามารถจัดการกับข้อมูลที่ได้รับ และสามารถตัดสินใจได้ตามสถานการณ์ด้วยความเชื่อของผู้ป่วยและครอบครัว เพื่อให้การให้คำแนะนำเกิดประโยชน์สูงสุด ดังภาพที่ 18 (ฉันทชัย, 2546)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 18 การให้คำปรึกษาเกี่ยวกับโอกาสของการเกิดโรค Familial Hypercholesterolemia ในรุ่นถัดไป

(ก) โอกาสของการเกิดโรค FH ในรุ่นถัดไปในกรณีที่พ่อ หรือ แม่เป็น เฮเทอโรไซกัส

(ข) โอกาสของการเกิดโรค FH ในรุ่นถัดไปในกรณีที่พ่อ และ แม่เป็น เฮเทอโรไซกัส

ที่มา: Centre for Genetics Education (2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยคนไทยที่แสดงอาการของโรค familial hypercholesterolemia (FH) และสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วย ที่มารับการรักษาที่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด (DNA extraction from whole blood)

2.1.1 Absolute ethanol (EtOH)

2.1.2 Chloroform

2.1.3 0.2 M Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

2.1.4 Isopropanol

2.1.5 Lysis buffer pH 7.5 (0.1 M Trisma base, 0.5 M Sucrose, 10% Triton X 100)

2.1.6 3M Sodium acetate pH 5.6

2.1.7 Nondidet

2.2.8 10X Sodium chloride-Tris-EDTA buffer pH 7.5 (10X STE buffer)

(0.2 M Trisma base, 0.01 M EDTA, 0.1 M NaCl)

2.1.9 20 mg/ml Proteinase K

2.1.10 Phenol (TE-buffer saturated phenol)

2.1.11 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

2.2.12 10X Tris boric EDTA buffer pH 8.0 (10X TBE buffer) (0.89 M Tris-HCl, 0.89 M Boric acid, 0.02 M EDTA)

2.2.13 Tris-EDTA buffer pH7.5 (TE buffer) (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) และ electrophoresis

2.2.1 100 bp ladder

2.2.2 SeaKem[®] LE agarose บริษัท BioWhittaker Molecular Applications

ประเทศอเมริกา

2.2.3 Bromophenol blue

2.2.4 10 mM of each dNTPs

2.2.5 0.2 M Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

2.2.6 *Taq* DNA polymerase 5 U/μl บริษัท Yeastern Biotech Co.,Ltd ประเทศไต้หวัน

2.2.7 Ethidium bromide 10 mg/ml

2.2.8 Ficoll-bromphenol blue (10% Ficoll, 0.15% Bromphenol blue, 1X TBE)

2.2.9 Magnesium chloride

2.2.10 Nusieve

2.2.11 10X PCR reaction buffer with 20 mM MgCl₂ (200 mM Tris-HCl, 500 mM

KCl) บริษัท Yeastern Biotech Co.,Ltd ประเทศไต้หวัน

2.2.12 10X TBE buffer pH 8.0 (0.89 M Tris-HCl, 0.89 M Boric acid,

0.02 M EDTA)

3. เครื่องมือ

3.1 หลอดทดลองขนาด 0.2 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml

3.2 เครื่องแก้ว (glasswares)

3.3 ปิเปต ขนาด 0.1-2 μl, 0.5-10 μl, 10-100 μl, 50-200 μl, 100-1000 μl บริษัท Eppendorf

ประเทศเยอรมนี

3.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า

3.5 Laminar flow

3.6 ตู้แช่แข็ง -20°C

3.7 ตู้แช่แข็ง -80°C

3.8 ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)

3.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Clifton บริษัท Electro LTD. ประเทศอังกฤษ

3.10 pH meter

- 3.11 เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie 2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.12 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Denville 260D บริษัท Denville scientific inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.13 เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น DyNA Quant 200 บริษัท Amersham Pharmacia Biotech ประเทศสวีเดน
- 3.14 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Sprint Thermal Cycle) บริษัท Thermo Electron Corporation ประเทศอเมริกา
- 3.15 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipments) รุ่น Intelligent Electrophoresis Unit i-MyRun.N บริษัท COSMO BIO Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- 3.16 ตัวแปลงกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น EPS301 บริษัท Amersham Pharmacia Biotech ประเทศสวีเดน
- 3.17 ชุดวิเคราะห์และถ่ายภาพเจล (Dolphin Series Gel Image Documentation System) บริษัท WEALTEC CORP ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.18 ชุด QIAquick PCR Purification Kit บริษัท QIAGEN Inc. ประเทศ USA
- 3.19 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencer) รุ่น ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, ABI Prism® BigDyeTTM terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits version 3.1, 310 Genetic analyzer buffer with EDTA, POP-6 polymer, 50 cm capillary บริษัท Applied Biosystem ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ (primers) ซึ่งจำเพาะเจาะจงต่อยีนตัวรับแอลดีแอลที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด 19 คู่ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะเจาะจงกับส่วนของ promoter ของยีนตัวรับแอลดีแอล 1 คู่ และ ไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะเจาะจงกับแต่ละ exon ของยีนตัวรับแอลดีแอลอีก 18 คู่ ที่ออกแบบโดย Nissen *et al.* (1996) ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะเจาะจงต่อยีนตัวรับแอลดีแอลที่ใช้ในการทดลอง

			โปรแกรม *	ขนาดของผลผลิต พีซีอาร์ (bp)
Promoter	forward primer	GAGTGGGAATCAGAGCTTCACGGGT	1	155
	reverse primer	CCACGTCATTACAGCATTCAATG		
Exon 1	forward primer	ACTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTC	4	305
	reverse primer	GGATGGAGTGATTATTTGTACCC		
Exon 2	forward primer	CTGATTCTGGCGTTGAGAGACCCT	1	254
	reverse primer	AATTCAAGACCAGCCTGGCC		
Exon 3	forward primer	AAGTGCTGGGATTACAGCGTGAGCC	2	257
	reverse primer	CCCCAGGACTCAGATAGGCTCAATAG		
Exon 4	forward primer	GTGGGAGACTTACACGGTGATGGT	1	540
	reverse primer	GCATGTTGTTGAAATCCACTTCG		
Exon 5	forward primer	TTGAACTCCTGGGCTCAAGCAATCCTCC	2	329
	reverse primer	CAAGCAGCAAGGCAGACACAATGGG		
Exon 6	forward primer	TCCTTCCTCTCTCTGGCTCTCACAG	1	173
	reverse primer	GCAAGCCGCCTGCACCGAGACTCAC		
Exon 7	forward primer	TGACCAGTCTGCATCCCTGGCCCTG	1	182
	reverse primer	GGCCCAGGGCTCAGTCCACCGGGG		
Exon 8	forward primer	ATCGCTCCGTCTCTAGGCCATTGG	1	319
	reverse primer	ATGAGTCTGTGCCAAAGTTCAGAGG		
Exon 9	forward primer	TCCATCGACGGTCCCCCTTGACCC	2	273
	reverse primer	AGCCCTCATCTCACCTGCGGGCCAA		
Exon 10	forward primer	AGATGAGGGCTCCTGGTGCGATGCC	1	298
	reverse primer	AGCCCTCAGAGTCTGGATACGCAC		
Exon 11	forward primer	CAGCTATTCTCTGTCTCCACCAG	1	169
	reverse primer	TGGGACGGCTGTCTGCGAACATAC		
Exon 12	forward primer	GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT	3	210
	reverse primer	CACCTAAGTGCTTCGATCGTACG		
Exon 13	forward primer	GTCATCTTCCTTGCTGCCTG	1	218
	reverse primer	GTTTCCACAAGGAGGTTTCAAGGTT		
Exon 14	forward primer	CTGATGATCTCTCGTTCCCTGCCTGAC	1	242
	reverse primer	CAGTTGGAGGACACAGGACGCAGA		
Exon 15	forward primer	GAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACT	1	247
	reverse primer	GTGTGGTGGCGGGCCAGTCTTTAC		
Exon 16	forward primer	CTTAGACCTGGGCCTCACTCTTGC	1	182
	reverse primer	CCAGGCACGAGGTCACATAGC		
Exon 17	forward primer	CAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCCT	1	230
	reverse primer	GCCATGGCTCTGGCTTTCTAGAG		
Exon 18	forward primer	TCCGCTGTTTACCATTGTGTCAG	1	126
	reverse primer	AATAAAACAAGGCCGCGAGGTCTC		

* **โปรแกรม 1** 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 65 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ; **โปรแกรม 2** 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 68 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ; **โปรแกรม 3** 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา ; **โปรแกรม 4** 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 58 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบปฏิกิริยา

ที่มา: Nissen *et al.* (1996)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือด 5 ml ใส่หลอด polypropylene ขนาด 15 ml ที่มี 0.2 M EDTA ปริมาตร 250 μ l เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยกลับหลอดขึ้นลงเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วย

2.1 การแยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (วันที่ 1) (Sambrook *et.al.*, 2001)

2.1.1 นำตัวอย่างเลือดมาปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะพบการแบ่งชั้นของเลือด โดยมีการแบ่งชั้นของพลาสมาข้างบน และชั้นของเม็ดเลือดแดงข้างล่าง

2.1.2 ใช้ pasture pipet ดูดชั้นของเม็ดเลือดแดง และพลาสมาทิ้ง โดยให้เหลือของเหลวที่อยู่กันหลอดประมาณ 1-2.5 ml

2.1.3 เติม lysis buffer ลงในหลอดทดลองจากข้อ 2.1.2 ให้ได้ปริมาตร 14 ml แล้วกลับหลอดขึ้นลง หรือ ให้มีการผสมกันโดยใช้เครื่องเขย่า (vortex) เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก จะสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง

2.1.4 นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทั้งส่วนที่เป็น supernatant จะเห็นเป็นตะกอน (pellet) บริเวณส่วนล่างของหลอด ถ้ายังมองเห็นเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนอยู่ในตะกอนให้ปฏิบัติตามข้อ 2.1.3 – 2.1.4 ซ้ำอีก 1-2 ครั้ง

2.1.5 นำหลอดทดลองจากข้อ 2.1.4 มาใส่ nondidet ให้ได้ปริมาตร 14 ml แล้วผสมกันจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทั้งส่วนที่เป็น supernatant จะเห็นเป็นตะกอน (pellet) บริเวณส่วนล่างของหลอด

2.1.6 ใส่ 10X STE 300 μ l 10% SDS 150 μ l proteinase K 100 μ l แล้วเติม distilled water ให้ได้ปริมาตร 2 ml แล้วใช้ pasture pipette ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน นำไปปั่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ที่กำลังก้นไว้ 1 คืน

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMCs (วันที่ 2)

2.2.1 เติมฟีนอล ให้มีปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลายจากข้อ 2.1.6 ผสมให้เข้ากัน และเขย่าเบา ๆ นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.2.2 ดูดสารละลายส่วนบนทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml แล้วเติมฟีนอลให้มีปริมาตรเป็น 1 เท่า คั่วหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.2.3 ดูดสารละลายส่วนบนทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และเติมสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของสารละลายทั้งหมด คั่วหลอดไปมา แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

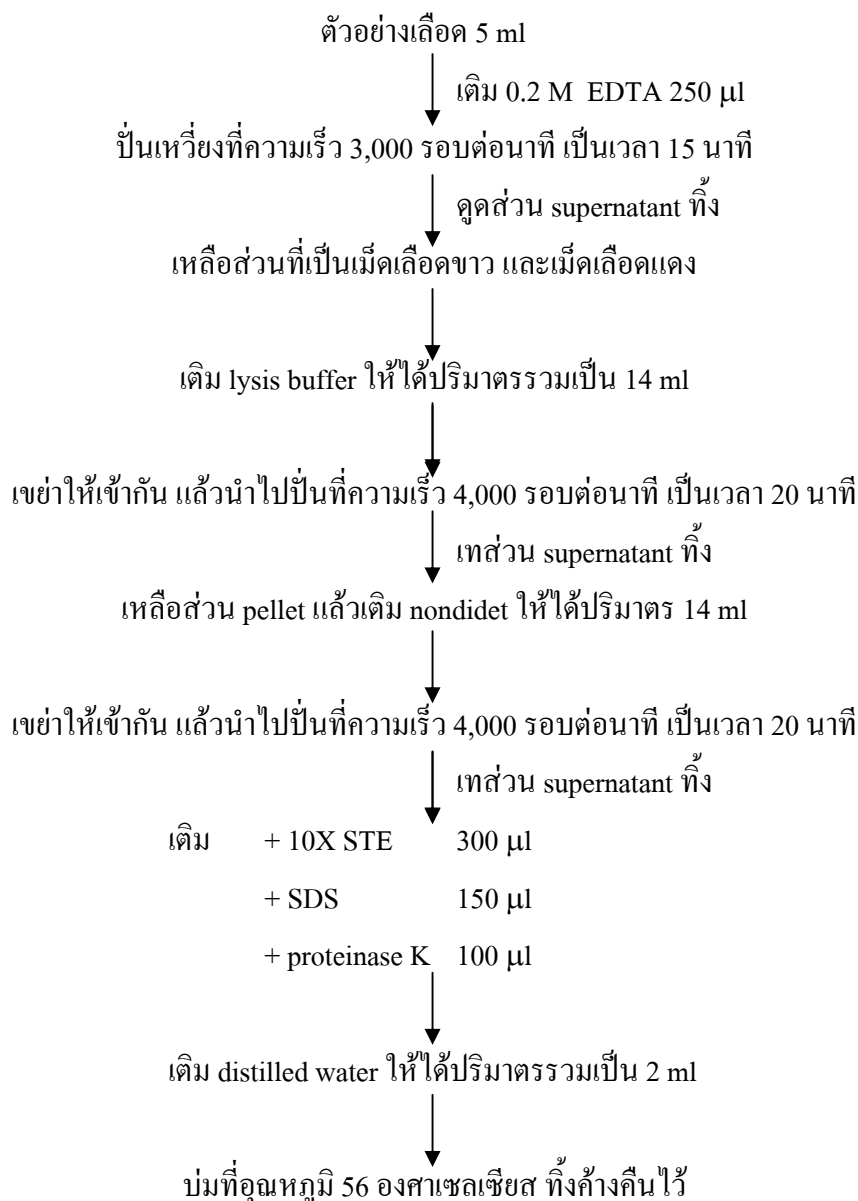
2.2.4 ดูดสารละลายส่วนบนทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และเติม 3M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่า และเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรสารละลายที่มีอยู่ ผสมเบา ๆ จะสังเกตเห็นการตกตะกอนของสายดีเอ็นเอเกิดขึ้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.2.5 ที่ส่วนที่เป็นน้ำใสแล้วเติม 70% alcohol ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่ส่วนที่เป็นน้ำใสแล้วเติม absolute alcohol 1 ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วที่ส่วนที่เป็นน้ำใส จะได้ดีเอ็นเออยู่ที่บริเวณก้นหลอด

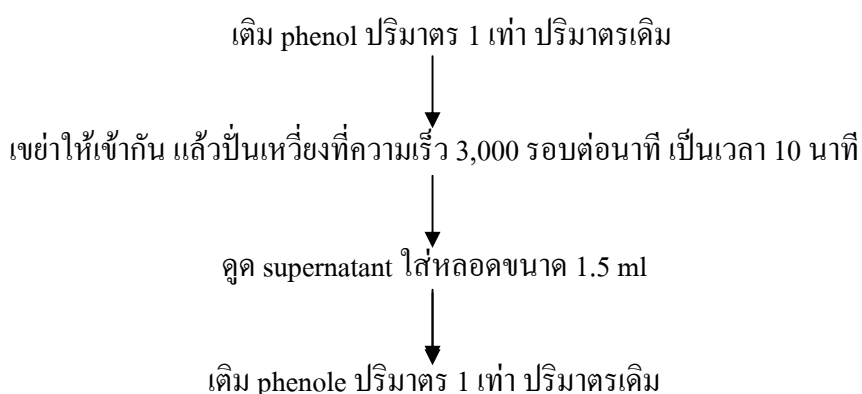
2.2.6 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH8.0 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

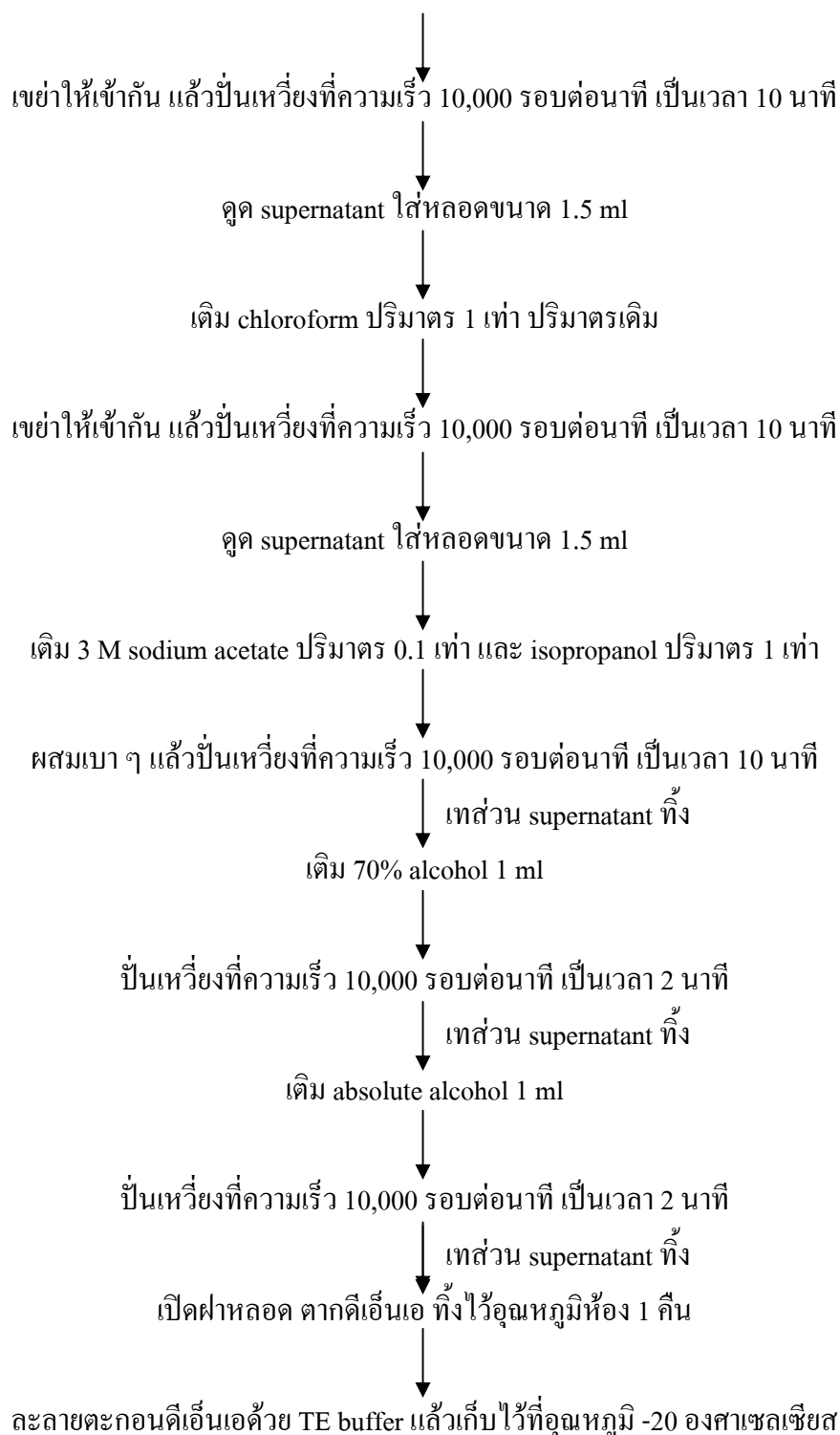
แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดจีโนมกดีเอ็นเอ

วันที่ 1



วันที่ 2





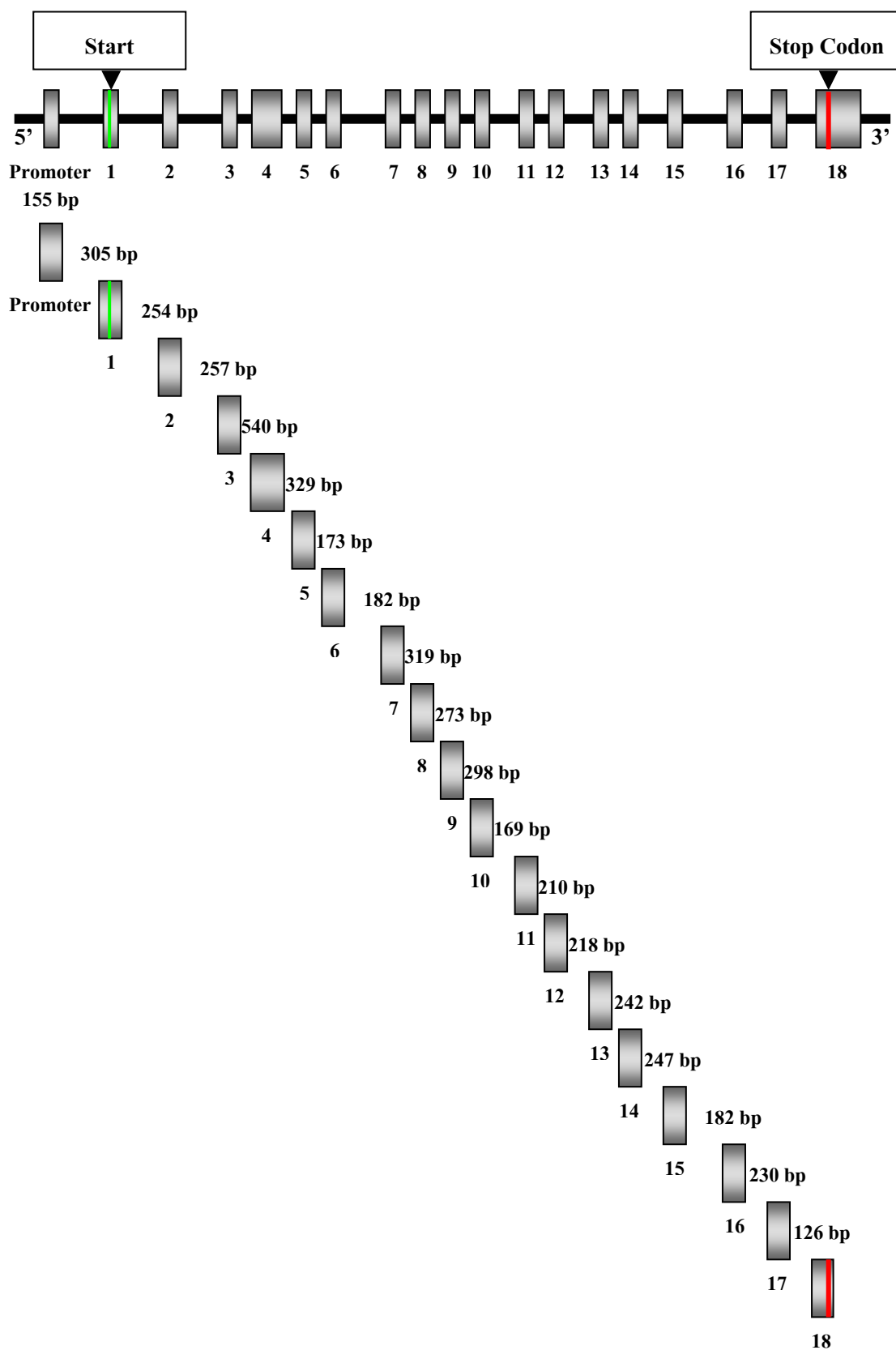
3. การตรวจสอบคุณภาพและหาปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและหาปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อม ๆ กัน คือวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วิธีการวัดการดูดกลืนแสงเนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 nm (โปรตีนจะดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 280 nm) ดังนั้นจึงใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 µg/ml สามารถดูดแสงได้ค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 260 nm (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 ปริมาณที่หาได้โดยวิธีนี้จะแน่นอนและยังตรวจสอบคุณภาพได้ด้วยโดยเปรียบเทียบค่า OD_{260} และ OD_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260} และ OD_{280} ประมาณ 1.8 ถ้าได้ค่ามากแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปน และถ้าได้ค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนและฟีนอล

ในการทดลองนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางในอัตราส่วน 1:500 และวัดค่าความดูดกลืนแสงจดบันทึกค่าที่วัดได้ และคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้สูตร ปริมาณดีเอ็นเอ (µg/ml) = $OD_{260} \times \text{dilution} \times 50$ (µg/ml) จดบันทึกปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณได้และเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 50 µg/ml

4. การเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณตำแหน่งของ promoter และตำแหน่งของแต่ละ exon ของยีนตัวรับแอลดีแอลด้วยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใน reaction mixture ที่ใช้ปริมาตร 25 µl ประกอบไปด้วย 1X PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.12 mM dNTPs, 0.5 unit ของ *Taq* DNA polymerase, 0.2 µM primer และ DNA template 20 ng ที่ได้จากการสกัด จีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วย โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้รอบปฏิกิริยาตามตารางที่ 5 (ภาพที่ 19) จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis ต่อไป



ภาพที่ 19 ชิ้นส่วนของ promoter และ exon ต่าง ๆ ของยีนตัวรับแอลดีแอลที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

5. การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจล

ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจล โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ใน 1X TBE buffer โดยมีวิธีการดังนี้

5.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวี (comb) ให้เรียบร้อย

5.2 ชั่งผงอะกาโรส 0.5 g เทใส่ขวดรูปชมภูจากนั้นเติม 1X TBE buffer 25 ml เขย่าให้เข้ากัน

5.3 หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนโดยใช้ไมโครเวฟ เป็นเวลาประมาณ 2 นาที เขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อให้อะกาโรสละลายจนหมด ซึ่งจะเห็นเป็นสารละลายใส

5.4 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 ml เสียบหวีลงไปตรงตำแหน่งเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ดีเอ็นเอปล่อยให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

5.5 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟริซิส ใส่ 1X TBE buffer ให้ท่วมเจลโดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 mm

5.6 ตัดพาราฟิล์มให้ได้ขนาดพอเหมาะ คูดสารละลายดีเอ็นเอหรือสารละลายที่ผ่านการทำพีซีอาร์ 5 µl ผสมกับ loading buffer 1 µl แล้วหยอดลงไปลงในช่องในแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยช่องแรกจะใส่ DNA size marker แล้วจึงหยอดสารละลายอื่น ๆ ในช่องถัดไปตามลำดับ

5.7 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 5-10 V/cm หรือใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

5.8 ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ โดยดูจากสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer แล้วจึงปิดเครื่องโดยใช้ระยะเวลาประมาณ 90 นาที

5.9 นำเจลมาข้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide (1 µg/ml)) เข้มข้น 1 µl/ml เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

5.10 นำเจลมาใส่ในกล่องพลาสติก ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอออก โดยใช้เวลาประมาณ เป็นเวลา 20-30 นาที

5.11 นำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากการเปรียบเทียบระยะทางที่ ผลผลิตพีซีอาร์เคลื่อนที่ไปกับระยะทางที่ ดีเอ็นเอมาตรฐานเคลื่อนที่ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แล้วบันทึกภาพด้วยชุดถ่ายภาพเจล

6. การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาโพลีเมอร์พีซีอาร์ด้วยวิธี SSCP

การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาโพลีเมอร์พีซีอาร์ด้วยวิธี SSCP หลังจากตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจล จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 1.5 μ l และ loading buffer (0.04% (w/v) bromophenol blue, 0.04% (w/v) xylene cyanol, 0.04M EDTA, 67% (v/v) formamide) ปริมาตร 10 μ l ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง แล้วนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้เกิดโครงสร้างจำเพาะ และนำไปตรวจหาโพลีเมอร์พีซีอาร์ด้วยวิธี SSCP ต่อไป

7. การแยกดีเอ็นเอโดย nondenaturing polyacrylamide gel

7.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

7.1.1 นำแผ่นกระจกขนาด 15x17 cm สำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วย 95% ethanol ให้สะอาดทั้งสองแผ่น ปล่อยให้แห้ง

7.1.2 นำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ริมขอบกระจกทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองแผ่น และสอดเส้นยางขึ้นระหว่างขอบนอกระหว่างกระจกทั้งสองแผ่นและใช้คลิปหนีบยึดกระจกสองแผ่นทั้งสามด้านให้อยู่คงที่เพื่อไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา

7.2 การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล ใช้เจลเข้มข้น 6% (acrylamide : bisacrylamide = 19 : 1 (%C = 5%)) โดยมีส่วนผสมดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 6% (19 : 1)

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6% (ปริมาตรรวม 30 ml)	
40% acrylamide (19 : 1)	4.5 ml	
10X TBE*	1.5 ml	
น้ำกลั่น	24 ml	
20% APS**	210 µl	} เติมหลังสุด
TEMED***	7 µl	
* TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA		
** APS = ammonium persulfate		
*** TEMED = N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine		

ผสมอะครีลาไมด์ 10X TBE buffer และ น้ำ ในบีกเกอร์ เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันจึงเติม 20% APS และ TEMED เขย่าเบา ๆ อีกครั้งให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หัวแบบช่อง (well type) ลงไปด้านบน ปลดปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ถ้าปล่อยเจลไว้ข้ามคืนควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิดด้านบน และล่างของเจลไว้เพื่อไม่ให้ความชื้นระเหย

7.3 การทำอิเล็กโทรโฟริซิส

7.3.1 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟริซิส เติม 0.5X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ในกระจก

7.3.2 ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง ทำ pre-run 20-30 นาที ใช้ความต่างศักย์คงที่ 200 โวลต์ จากนั้นปิดเครื่อง ใช้ปิเปตหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในช่องแต่ละช่อง

7.3.3 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิมเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

7.3.4 ปิดเครื่อง ดึงบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน นำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

8. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีพลอตตรงสี่ (การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท)

8.1 นำเจลออกจากกระชกที่ประกอบอยู่มาแช่ในสารละลายที่ 1 (Solution I (10% ethanol, 0.5% acetic acid)) นาน 3 นาที 2 ครั้ง โดยเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

8.2 เทสารละลายที่ 1 ทิ้ง เทสารละลายที่ 2 (Solution I (0.1% silver nitrate (AgNO_3))) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 15 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าอย่างสม่ำเสมอ

8.3 เทสารละลายที่ 2 ทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อกำล้างซิลเวอร์ไนเตรทที่มากเกินไป ในขั้นตอนนี้ไม่ควรเกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนานซิลเวอร์ไนเตรทจะหลุดออกหมดต้องทำการย้อมใหม่

8.4 เทน้ำกลั่นที่ใช้สำหรับล้างซิลเวอร์ไนเตรทที่มากเกินไปออก แล้วเทสารละลายที่ 3 (Solution III (1.5% sodium hydroxide (NaOH), 0.1% formaldehyde)) ที่เตรียมใหม่ ๆ เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าอย่างสม่ำเสมอ ประมาณ 10-15 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

8.5 เทสารละลายที่ 3 ทิ้ง แล้วเทสารละลายที่ 4 (Solution IV (0.75% sodium carbonate (Na_2CO_3))) เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า 5-10 นาที

8.6 เทสารละลายที่ 4 ทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น ประกบด้วยกระดาษเซลโลเฟนที่เปียกจึงให้ตั้ง แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืน

9. การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

หลังจากตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธี SSCP เมื่อพบโพลีเมอร์พีซีอาร์แล้ว จากนั้นต้องเตรียมตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ที่พบโพลีเมอร์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปหาลำดับเบส โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 2% (w/v) agarose gel จากนั้นส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ไปที่ศูนย์วิจัยโรงพยาบาลรามารบดิ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ต่อไป

10. การหาลำดับเบสด้วยวิธี automated sequencing และการวิเคราะห์ผลที่ได้

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ควบคู่กับการใช้ ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits version 3.1 และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปทำการตกตะกอนโดยเติม 3M sodium acetate และ 125 mM EDTA ตามด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัดผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที คือด่วนใส่ทิ้งแล้วล้างด้วย 70% ethanol ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที คือด่วนใส่ทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในที่ไมโครนแสง และนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI Prism 3100 Genetic Analyzer

นำผลการหาลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ในยีนตัวรับแอลดีแอลในผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยคนไทยจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวรับแอลดีแอลที่สมบูรณ์ที่ได้จากฐานข้อมูล (NC_000019 REGION: 11061132..11105490) เพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรค FH ในผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยคนไทย

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างเลือดและการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยคนไทยที่แสดงอาการของโรค familial hypercholesterolemia (FH) หรือที่มีลักษณะเสี่ยงต่อการเกิดโรค คือมีระดับคลอเลสเตอรอลสูง (มากกว่า 200 mg/dl) โดยเฉพาะชนิดแอลดีแอล (มากกว่า 130 mg/dl) โดยที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ ในเกณฑ์ปกติ (ไม่เกิน 150 mg/dl) อาจร่วมกับการมีลักษณะ xanthoma ที่เป็นก้อนไขมันที่ผิวหนัง และ atheroma ซึ่งเป็นก้อนไขมันที่เส้นเลือดร่วมด้วย หรือเคยมีประวัติเข้ามารับการรักษาด้วยเรื่อง กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction, MI) ที่มารับการรักษาที่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ได้จำนวน 19 ราย โดยเก็บตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดปลอดเชื้อที่มีสารละลาย 0.2M EDTA 250 μ l เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อบรรจุการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอต่อไป

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพและหาปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย

นำเลือดผู้ป่วยทุกรายมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ ฟีนอล-คลอโรฟอร์มตามวิธีของ Sambrook *et al.*, 2001 พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวขุ่นบริเวณก้นหลอด จากนั้นนำ ดีเอ็นเอที่ได้มาละลายด้วย TE buffer เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพและหาปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

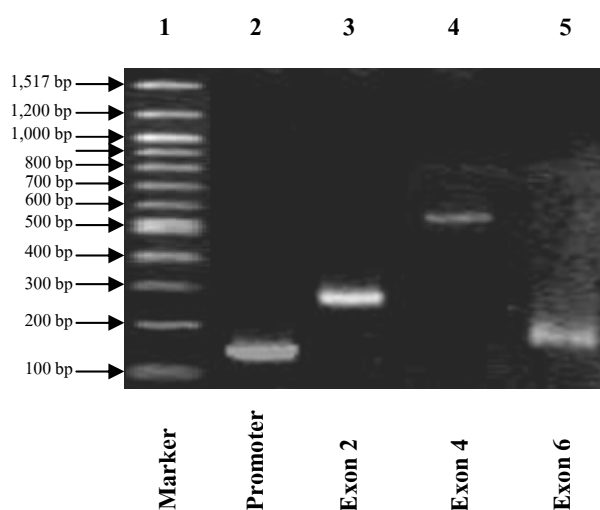
นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:500 และตรวจสอบคุณภาพ และหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 nm (OD_{260}) จดบันทึกค่าที่วัดได้ และคำนวณหา ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้สูตร ปริมาณดีเอ็นเอ (μ g/ml) = $OD_{260} \times \text{dilution} \times 50$ (μ g/ml) จดบันทึกปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณได้ และนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางเพื่อให้ได้ ความเข้มข้น 50 μ g/ml และตรวจสอบคุณภาพโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วง คลื่น 260 nm (OD_{260}) เทียบกับ การดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 nm (OD_{280}) ซึ่งสารละลาย ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260} และ OD_{280} ประมาณ 1.8 ซึ่งถือว่าค่อนข้างบริสุทธิ์

เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์และเจือจางจนมีความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

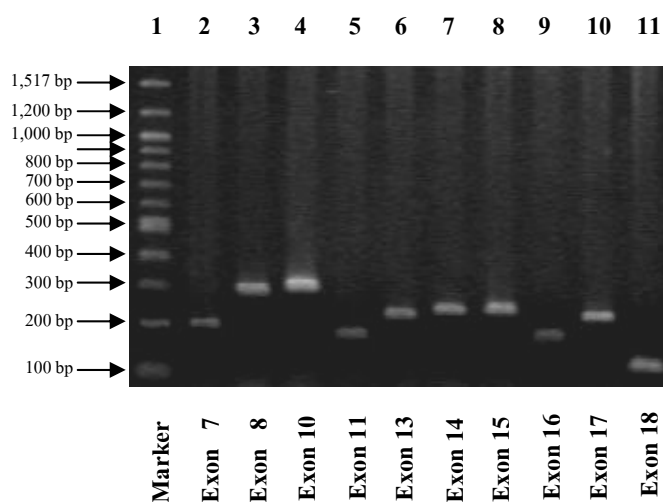
การเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณตำแหน่งของ promoter และตำแหน่งของแต่ละ exon ของยีนตัวรับแอลดีแอลด้วยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณทุก ๆ ส่วนของยีนตัวรับแอลดีแอล (บริเวณตำแหน่งของ promoter และแต่ละ exon (18 exons)) ด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยเครื่อง PCR Sprint Thermal Cycle โดยตั้งรอบปฏิกิริยาต่าง ๆ และนำมาตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR products) โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณมาตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ใน 1X Tris-Borate-EDTA buffer (TBE buffer) และต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 5-10 V/cm หรือใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ นำแผ่นเจลที่ได้มาตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์โดยเปรียบเทียบระยะทางที่ผลผลิตพีซีอาร์เคลื่อนที่ไปกับระยะทางที่ดีเอ็นเอมาตรฐานเคลื่อนที่ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แล้วบันทึกภาพด้วยชุดถ่ายภาพเจลได้ผลดังนี้

โปรแกรม 1 สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณตำแหน่งของ exon 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18 และส่วนของ promoter ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 20



(ก)

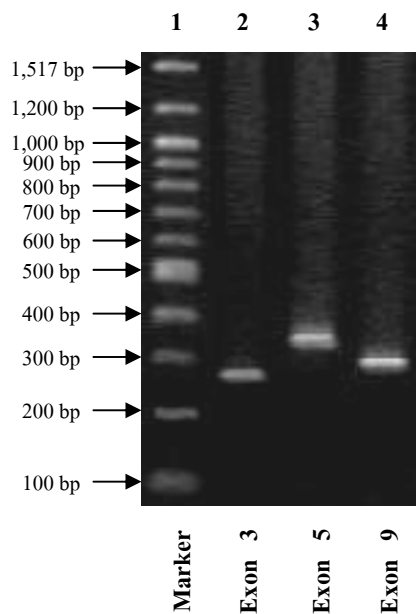


(ข)

ภาพที่ 20 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากรอบปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม 1

- (ก) 1 คีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)
2 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ promoter
3 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 2
4 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 4
5 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 6
- (ข) 1 คีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)
2 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 7
3 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 8
4 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 10
5 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 11
6 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 13
7 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 14
8 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 15
9 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 16
10 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 17
11 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 18

โปรแกรม 2 สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณตำแหน่งของ exon 3, 5 และ 9 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากรอบปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม 2

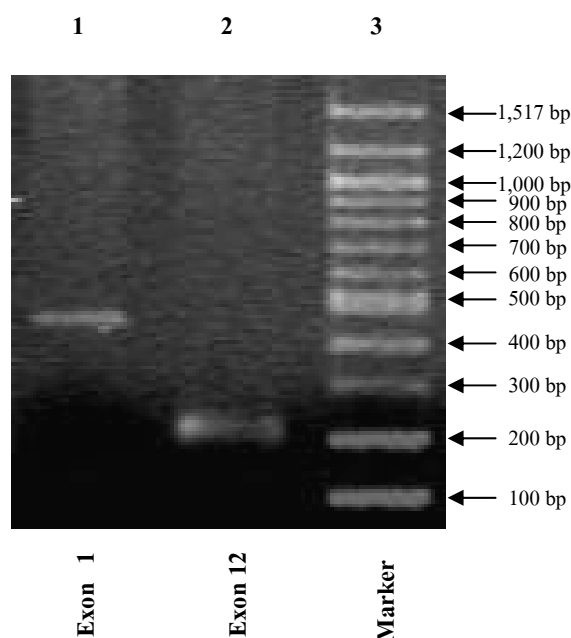
1 คีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

2 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 3

3 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 5

4 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 9

โปรแกรม 3 สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณตำแหน่งของ exon 1 และ โปรแกรม 4 สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณตำแหน่งของ exon 12 ได้ผล ดังแสดงในภาพที่ 22



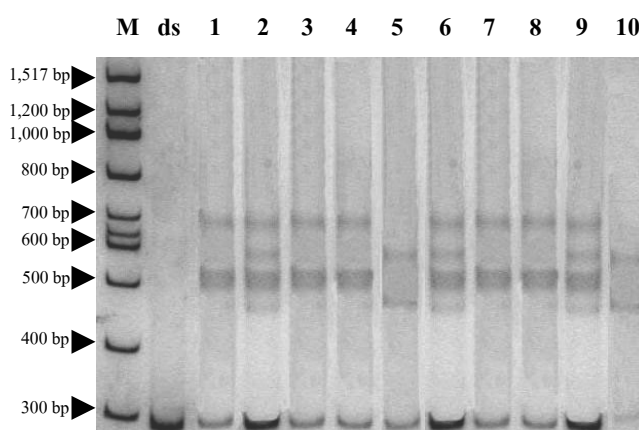
ภาพที่ 22 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากรอบปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม 3 และ 4

- 1 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 1
- 2 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนตัวรับแอลดีแอลบริเวณ Exon 12
- 3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

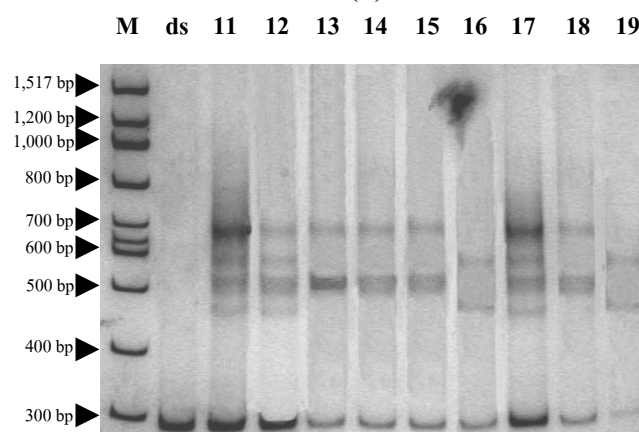
จากการตรวจผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจลพบว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนตัวรับแอลดีแอลในบริเวณตำแหน่งของ promoter และ ทั้ง 18 exons (ตั้งแต่ exon 1 ถึง 18) ดังภาพที่ 20 ถึง 22 มีขนาดประมาณ 150, 450, 250, 260, 550, 350, 180, 200, 300, 300, 300, 180, 220, 250, 250, 250, 180, 220 และ 120 คู่เบส ซึ่งทุกชิ้นส่วนใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังคือ 157, 304, 252, 257, 542, 329, 173, 182, 284, 273, 298, 169, 210, 260, 242, 245, 183, 226 และ 126 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งการที่ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังแสดงว่าน่าจะเป็นผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มอย่างเฉพาะเจาะจงกับที่ต้องการศึกษา ซึ่งจะนำมาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี SSCP และตรวจสอบอย่างละเอียดด้วยวิธี automated sequencing ต่อไป

การตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมด้วยวิธี SSCP

ผลจากการตรวจด้วยวิธี SSCP และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ในคนไข้ทั้ง 19 คน ปรากฏว่าพบ SSCP pattern ที่ผิดปกติ 15 รายใน exon 10 ดังแสดงในภาพที่ 23, 6 รายใน exon 11 ดังแสดงในภาพที่ 24, 11 รายใน exon 12 ดังแสดงในภาพที่ 25 และ อีก 2 รายใน exon 15 ดังแสดงในภาพที่ 26 ซึ่ง SSCP pattern ที่แตกต่างกันนั้นจะได้ศึกษาลำดับเบสบนดีเอ็นเอด้วยวิธี automated DNA sequencing



(ก)



(ข)

ภาพที่ 23 SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 10 15 ราย

(ก) M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

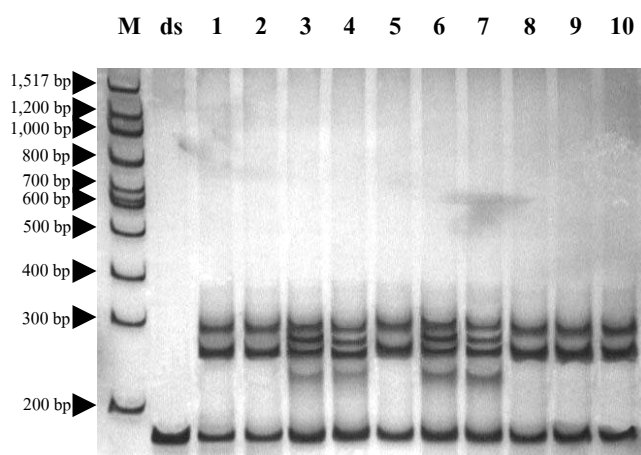
ds ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

1 ถึง 10 SSCP pattern ของ exon 10 ในผู้ป่วยรายที่ 1 ถึง 10

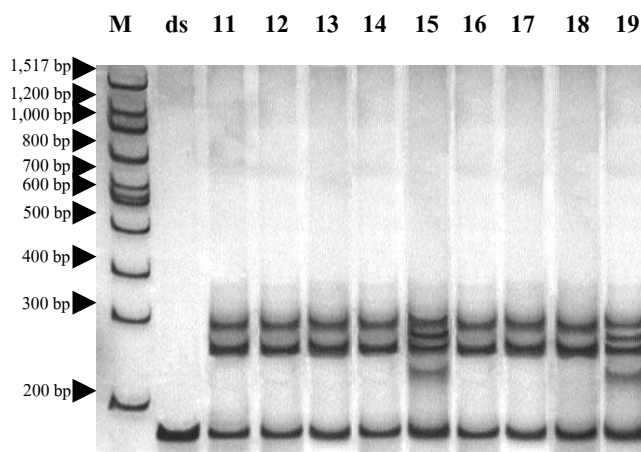
(ข) M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ds ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

11 ถึง 19 SSCP pattern ของ exon 10 ในผู้ป่วยรายที่ 11 ถึง 19



(ก)



(ข)

ภาพที่ 24 SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 11 6 ราย

(ก) M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

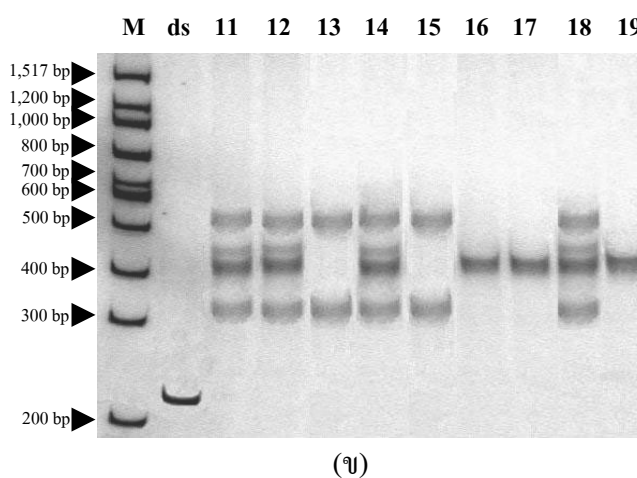
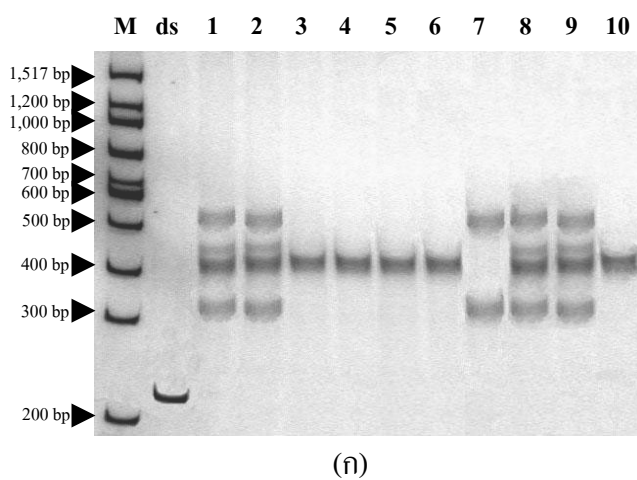
ds ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

1 ถึง 10 SSCP pattern ของ exon 11 ในผู้ป่วยรายที่ 1 ถึง 10

(ข) M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ds ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

11 ถึง 19 SSCP pattern ของ exon 11 ในผู้ป่วยรายที่ 11 ถึง 19



ภาพที่ 25 SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 12 11 ราย

(ก) M คีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

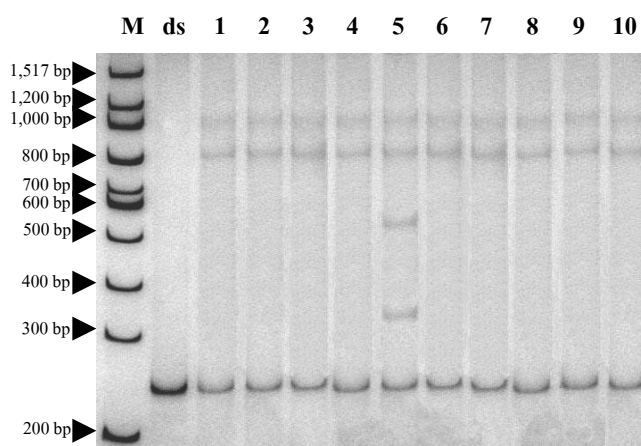
ds คีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

1 ถึง 10 SSCP pattern ของ exon 12 ในผู้ป่วยรายที่ 1 ถึง 10

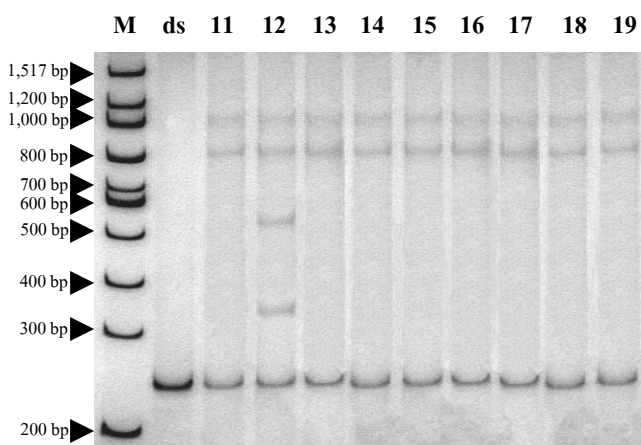
(ข) M คีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ds คีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

11 ถึง 19 SSCP pattern ของ exon 12 ในผู้ป่วยรายที่ 11 ถึง 19



(ก)



(ข)

ภาพที่ 26 SSCP pattern ของผู้ป่วยทั้ง 19 รายที่พบ SSCP pattern ที่ผิดปกติบริเวณ exon 15 2 ราย

(ก) M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ds ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

1 ถึง 10 SSCP pattern ของ exon 15 ในผู้ป่วยรายที่ 1 ถึง 10

(ข) M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ds ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

11 ถึง 19 SSCP pattern ของ exon 15 ในผู้ป่วยรายที่ 11 ถึง 19

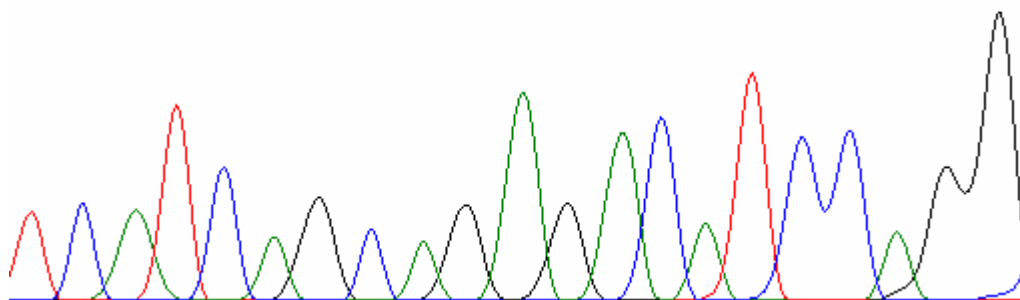
การที่นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี SSCP เพื่อหา SSCP pattern ที่ผิดปกติไปก่อนที่จะนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบอย่างละเอียดด้วยวิธี automated sequencing ต่อนั้น เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ เนื่องจากยีนตัวรับแอลดีแอลประกอบด้วยทั้งหมด 19 ส่วน คือ ส่วนของ promoter และส่วนที่เป็น exon อีก 18 exons และมีจำนวนผู้ป่วยที่จะทำการตรวจสอบทั้งหมดจำนวน 19 ราย ซึ่งถ้าทำการศึกษาด้วยวิธี automated sequencing เลยนั่นจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงจึงต้องทำการตรวจสอบด้วยวิธี SSCP เพื่อหา SSCP pattern ที่ผิดปกติไป ก่อนนำมาตรวจสอบด้วยวิธี automated sequencing ต่อ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากยีนตัวรับแอลดีแอล

การวิเคราะห์ผลที่ได้จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี automated sequencing

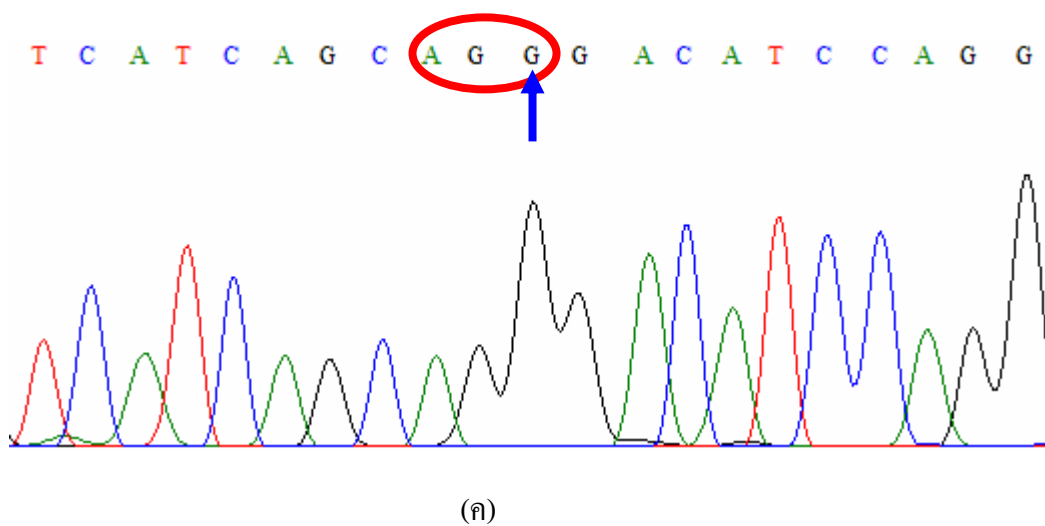
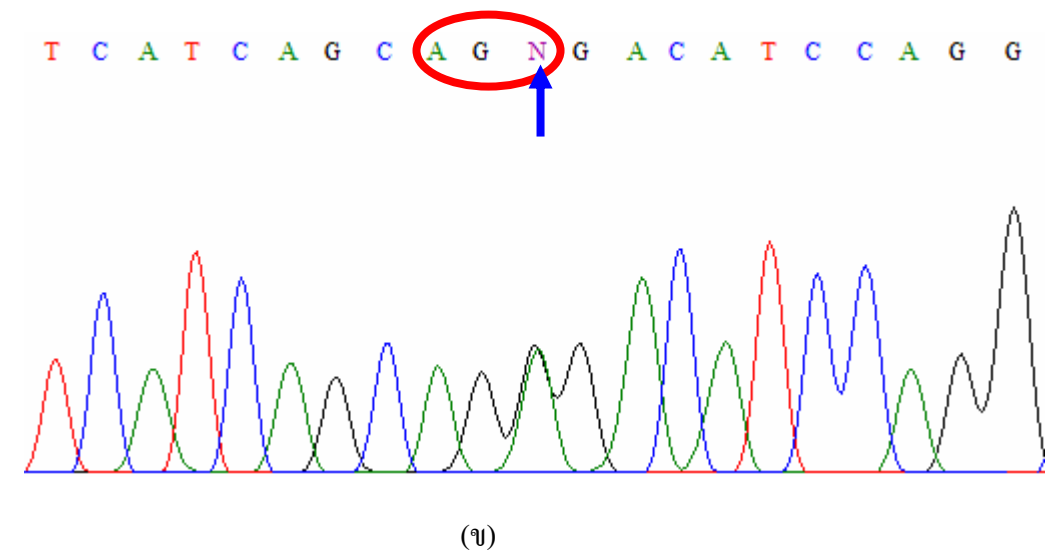
นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจพบ SSCP pattern ที่แตกต่างไปใน exon 10 exon 11 exon 12 และ exon 15 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kit จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์แล้วมาศึกษาลำดับเบสบนดีเอ็นเอด้วยวิธี automated DNA sequencing ต่อได้ผลดังนี้

บริเวณ exon 10 มีการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 24134 (A>G) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนและได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Warnich et al, 1992 จากฐานข้อมูล <http://www.ucl.ac.uk/fh/>) ดังภาพที่ 27 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 10

T C A T C A G C A G A G A C A T C C A G G



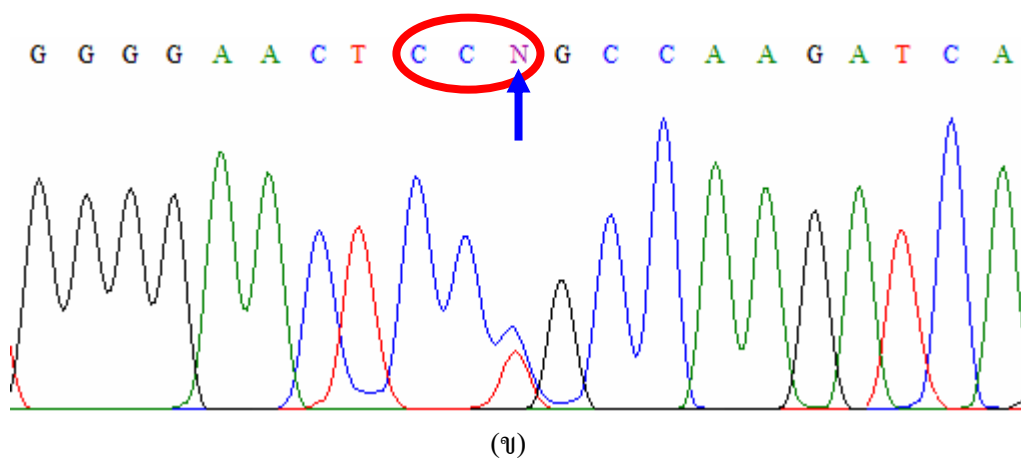
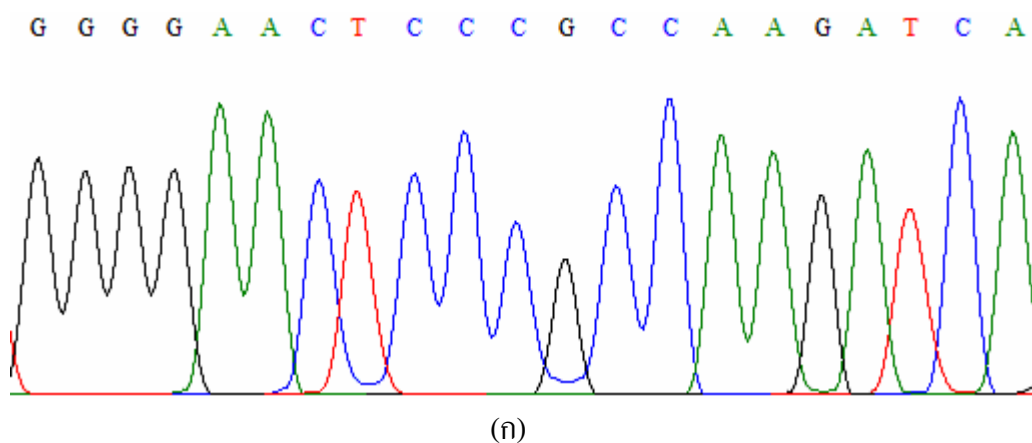
(ก)



ภาพที่ 27 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 10

- (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 5, 10, 16, 19
- (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 2, 6, 9, 11, 12, 17 (AA→AG)
- (ค) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 1, 3, 4, 7, 8, 13, 14, 15, 18 (AA→GG)

บริเวณ exon 11 มีการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 26669 (C>T) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนและได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Lerent et al, 1992 ; Mak et al, 1998 ; Saint-Jore et al, 1993 จากฐานข้อมูล <http://www.ucl.ac.uk/fh/>) ดังภาพที่ 28 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 11



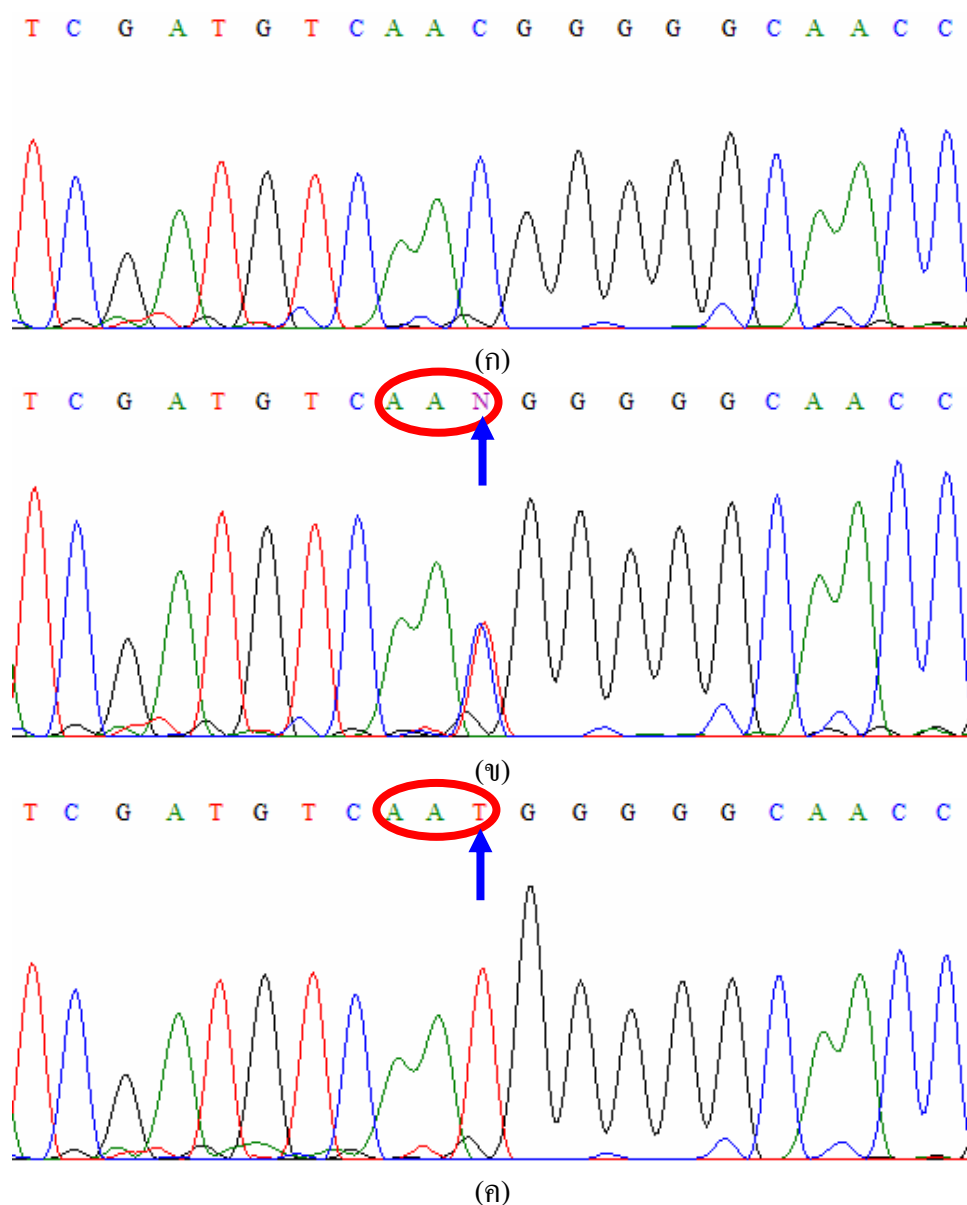
ภาพที่ 28 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 11

(ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17,

18

(ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 3, 4, 6, 7, 15, 19 (CC→CT)

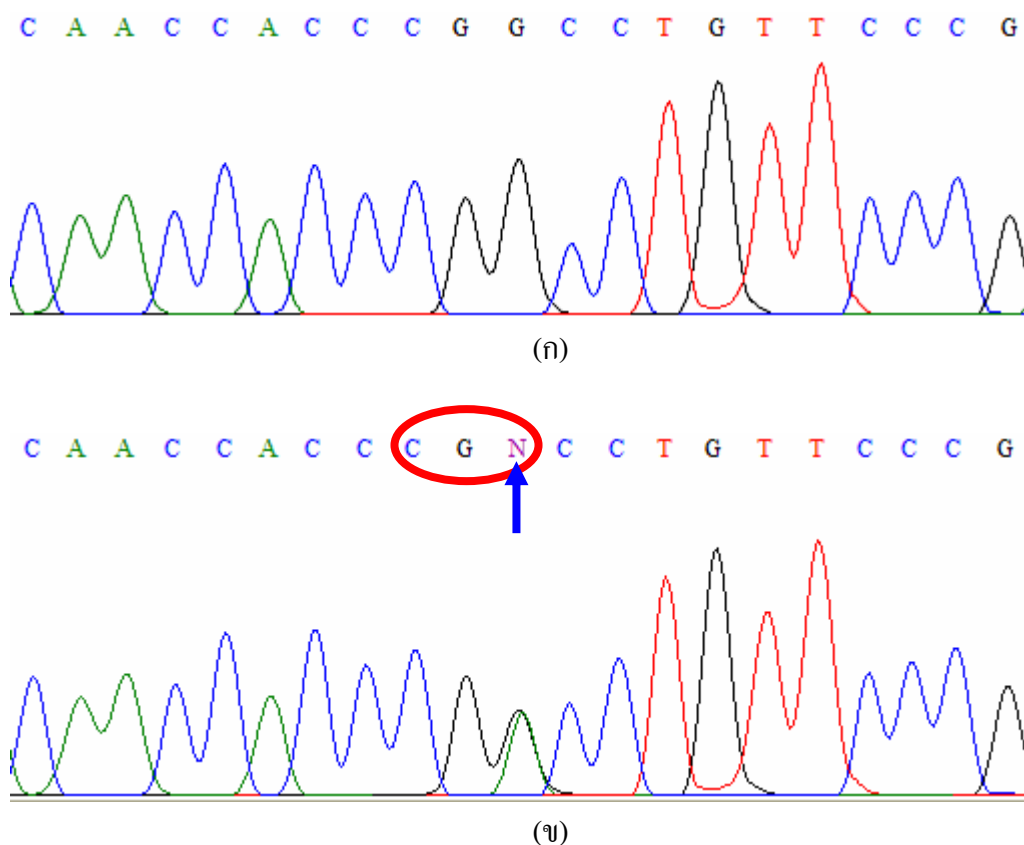
บริเวณ exon 12 มีการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 27471 (C>T) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนและได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Chaves et al, 1991 ; Fridlander et al, 1995 ; Humphries et al, 1993 ; Miserez et al, 1993 ; Puig et al, 1995 ; Zee et al, 1995 จากฐานข้อมูล <http://www.ucl.ac.uk/fh/>) ดังภาพที่ 29 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 12



ภาพที่ 29 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 12

- (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 3, 4, 5, 6, 10, 16, 17, 19
- (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 8, 9, 11, 12, 14, 18 (CC→CT)
- (ค) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 7, 13, 15 (CC→TT)

บริเวณ exon 15 มีการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 33810 (A>G) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนและได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Chaves et al, 1991 ; Giesel et al, 1988 ; Saint-Jore et al, 1993 จากฐานข้อมูล <http://www.ucl.ac.uk/fh/>) ดังภาพที่ 30 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 15



ภาพที่ 30 เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Exon 15

- (ก) ลำดับเบสของยีนปกติ และของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
- (ข) ลำดับเบสของผู้ป่วยคนที่ 1, 2, 8, 9, 11, 12, 14, 18 (GG→GA)

การเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ดังนั้นจึงไม่น่าส่งผลกระทบต่อโปรตีนที่จะถูกสังเคราะห์ ดังนั้นก็ไม่น่าจะส่งผลต่อการเกิดโรค ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง เรียกว่า Single nucleotide polymorphism (SNP) โดยในปัจจุบันให้ความสำคัญของ SNP ว่าน่าจะมีบทบาทอย่างยิ่งในการทำ

ให้เกิดความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรของลำดับเบสกับความสามารถในการตอบสนองต่อโรค และยา การศึกษา SNP ของยีนตัวรับแอลดีแอลจึงคาดว่าน่าจะมีประโยชน์ต่อไปในอนาคต หากมีการศึกษาผู้ป่วยมากพอจนทราบลักษณะของ SNPs ที่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรค และปัจจุบันได้มีการโครงการหา SNPs map ในคนไทยที่กำลังทำการวิจัยอยู่ ถ้าเสร็จสมบูรณ์อาจทำให้สามารถทำนายโรคล่วงหน้าก่อนที่จะแสดงอาการและสามารถเข้าใจถึงการตอบสนองต่อยากับผู้ป่วยได้มากขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบจำนวน 4 ตำแหน่งในผู้ป่วยทั้ง 19 คน สรุปไว้ในตารางที่ 7 และผลของการเปลี่ยนแปลงเบสทั้ง 4 ตำแหน่ง สรุปไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 สรุปการเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่งของผู้ป่วยทั้ง 19 ราย

No.	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 15
1	G	C	C/T	G
2	A/G	C	C/T	G
3	G	C/T	C	G
4	G	C/T	C	G
5	A	C	C	G/A
6	A/G	C/T	C	G
7	G	C/T	T	G
8	G	C	C/T	G
9	A/G	C	C/T	G
10	A	C	C	G

No.	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 15
11	A/G	C	C/T	G
12	A/G	C	C/T	G/A
13	G	C	T	G
14	G	C	C/T	G
15	G	C/T	T	G
16	A	C	C	G
17	A/G	C	C	G
18	G	C	C/T	G
19	A	C/T	C	G

ตารางที่ 8 สรุปผลของการเปลี่ยนแปลงเบสในแต่ละ exon

Exon	Mut. Name	Mut. Pos.	Codon	WT Codon	Mut.Codon	Event	WT AA	Mut. AA
10	24134A>G	24134	471*	AGA	AGG	A>G	Arginine	Arginine
11	26669C>T	26669	539*	CCC	CCT	C>T	Proline	Proline
12	27471C>T	27471	591*	AAC	AAT	C>T	Asparagine	Asparagine
15	33810A>G	33810	744*	CGA	CGG	A>G	Arginine	Arginine

* Start codon (ATG) at mRNA 94

Genomic DNA → NC_000019.8 (chro19 - 11061132-11105490)

cDNA → NM_000527.2 *LDLR* (mRNA)

จากการทดลองในครั้งนี้สามารถนำการเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่ง (exon 10, exon 11, exon 12 และ exon 15) มาจัดกลุ่มของ haplotype (ลำดับอัลลีลบนแขนข้างเดียวกันของโครโมโซม) ได้ 9 แบบ ดังตารางที่ 9

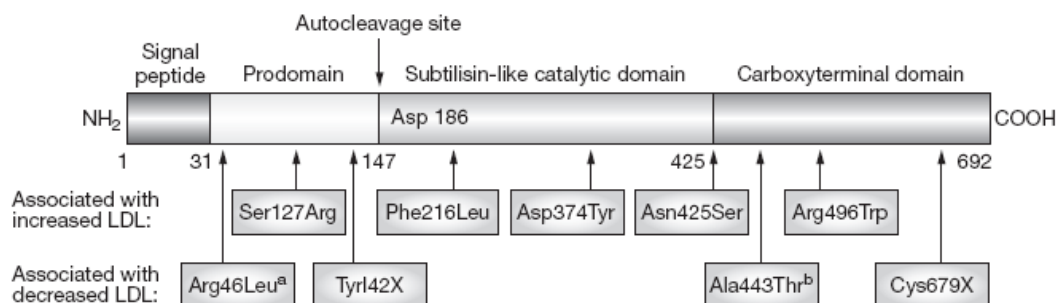
ตารางที่ 9 Haplotype ของการเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่ง

Haplotype แบบที่	X10	X11	X12	X15	ความถี่ Haplotype
1	A	C	C	A	0.05263
2	A	C	C	G	0.28343
3	A	C	T	A	0.00000
4	A	T	C	G	0.03236
5	G	C	C	G	0.19025
6	G	C	T	A	0.00000
7	G	C	T	G	0.31579
8	G	T	C	G	0.07291
9	G	T	T	G	0.05263

แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนก็ตาม แต่การเปลี่ยนแปลงของเบสที่พบทั้ง 4 ตำแหน่งนี้อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนก็เป็นได้ ดังนั้นการศึกษาต่อไปคือการวัดระดับการแสดงออกของยีนตัวรับแอลดีแอลโดยการวัดปริมาณโปรตีนตัวรับแอลดีแอลของผู้ป่วยที่มี Haplotype แบบต่าง ๆ ตามตารางที่ 9 ว่าแต่ละ Haplotype มีความสัมพันธ์ต่อระดับปริมาณของโปรตีนตัวรับแอลดีแอลหรือไม่ มีความสัมพันธ์มากน้อยต่างกันอย่างไร

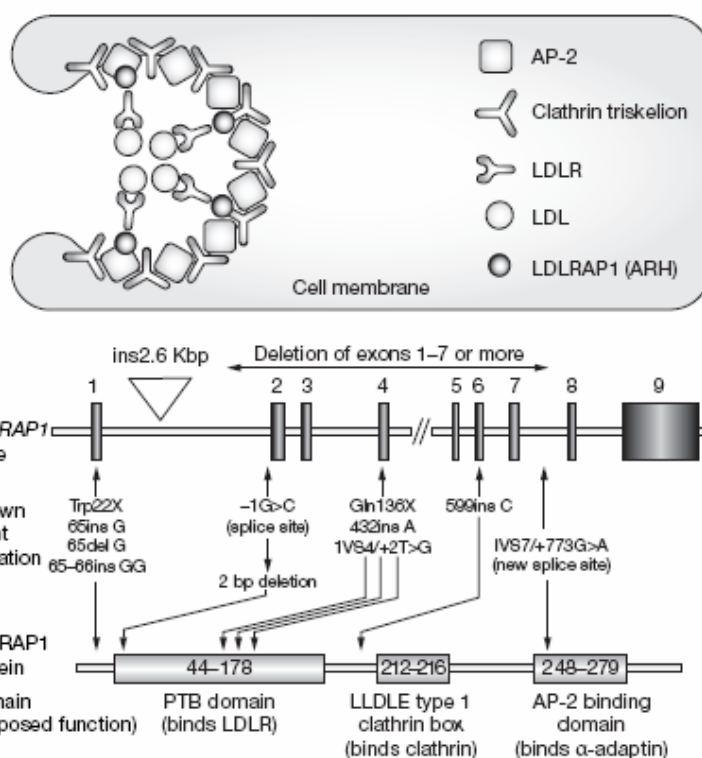
นอกจากความผิดปกติของยีนตัวรับแอลดีแอลจะทำให้เกิดโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฐมภูมิแล้ว เมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานว่ามียีนหนึ่งซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฐมภูมิคือ *PCHK9* (Soutar *et al.*, 2007) ซึ่งโดยปกติตัวรับเมื่อมีการจับกับไลเคนเพื่อนำเข้าสู่เซลล์แล้วตัวรับเหล่านั้นจะถูกนำกลับไปใช้ใหม่ (recycling) แต่ยีนนี้มีหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลายตัวรับบ้างชนิดเช่น ตัวรับแอลดีแอลเพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะสมดุลเมื่อเซลล์ได้รับคอเลสเตอรอลพอเพียงแล้ว ก่อนที่ตัวรับเหล่านั้นจะถูกนำกลับไปใช้ใหม่ ดังนั้นเมื่อมีการ

กลายพันธุ์บน *PCHK9* ทำให้การแสดงออกของยีนนี้มีมากกว่าปกติทำให้เกิดการสลายของตัวรับแอลดีแอลก่อนที่จะมีการถูกนำกลับไปใช้ใหม่ (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 ความหลากหลายของการกลายพันธุ์ในยีน *PCSK9* ที่เกี่ยวข้องกับระดับของแอลดีแอล
ที่มา: Soutar *et al.* (2007)

นอกจาก *PCSK9* ยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการนำแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการเอ็นโดไซโทซิสคือ *LDLRAP1* โดย *LDLRAP1* มีหน้าที่สร้างโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับตัวรับแอลดีแอลบริเวณ cytoplasmic domain เพื่อนำตัวรับที่จับกับแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์ ดังภาพที่ 32



ภาพที่ 32 ความหลากหลายของการกลายพันธุ์ในยีน *LDLRAP1* ที่เกี่ยวข้องกับการนำแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการเอ็นโดไซโทซิส

ที่มา: Soutar *et al.* (2007)

ดังนั้นเมื่อมีการกลายพันธุ์ใน *PCSK9* หรือ *LDLRAP1* จึงมีผลทำให้ตัวรับแอลดีแอลบนผิวเซลล์เช่น บนผิวของเซลล์ตับที่มีตัวรับแอลดีแอลอยู่มาก มีตัวรับแอลดีแอลบนผิวเซลล์ไม่เพียงพอที่จะนำแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์ ทำให้แอลดีแอลค้างคั่งอยู่ในกระแสเลือดมาก เมื่อแอลดีแอลค้างคั่งอยู่ในกระแสเลือดนานทำให้เกิด oxidation ทำให้เกิด oxidized LDL ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิดเส้นเลือดหัวใจตีบ และตันในที่สุด ซึ่งจะนำไปให้เกิดอาการกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction, MI) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจ และเป็นสาเหตุการตายสาเหตุหนึ่ง ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต (Soutar *et al.*, 2007)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษารังนี้ ได้ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อยีนตัวรับแอลดีแอลเบื้องต้นด้วยวิธี SSCP เพื่อหา SSCP pattern ที่ผิดปกติ ก่อนที่จะนำมาตรวจสอบอย่างละเอียดด้วยวิธี automated sequencing ต่อเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ เนื่องจากยีนตัวรับแอลดีแอลประกอบด้วยทั้งหมด 19 ส่วน คือ ส่วนของ promoter และส่วนที่เป็น exon อีก 18 exons และมีจำนวนผู้ป่วยที่จะทำการตรวจสอบทั้งหมดจำนวน 19 ราย เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากยีนตัวรับแอลดีแอล เนื่องจากถ้าทำการศึกษาด้วยวิธี automated sequencing เลยนั้นจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูง จากการตรวจสอบพบว่า SSCP pattern ที่ผิดปกติ 15 รายใน exon 10, 6 รายใน exon 11, 11 รายใน exon 12 และ อีก 2 รายใน exon 15 จากนั้นนำไปศึกษาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอต่อด้วยวิธี automated DNA sequencing พบการเปลี่ยนแปลงของเบสซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส หรือนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง และไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน จำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งไม่น่าส่งผลกระทบต่อโปรตีนที่จะถูกสังเคราะห์ และ SNPs ทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ น่าจะมีบทบาทในอนาคตหากมีการศึกษาผู้ป่วยมากพอจนทราบลักษณะของ SNPs ที่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรค และปัจจุบันได้มีโครงการหา SNPs map ในคนไทยที่กำลังทำการวิจัยอยู่ ถ้าเสร็จสมบูรณ์อาจทำให้สามารถทำนายโรคล่วงหน้าก่อนที่จะแสดงอาการและสามารถเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรของลำดับเบสกับความสามารถในการตอบสนองของยาต่อโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแบบปฐมภูมิในผู้ป่วยคนไทย

การศึกษาที่คาดว่าจะทำต่อไป คือการวัดระดับการแสดงออกของยีนตัวรับแอลดีแอลของผู้ป่วยที่มี Haplotype ที่พบจำนวน 9 แบบ เพื่อหาว่า Haplotype แบบต่าง ๆ ที่พบมีความสัมพันธ์กับยีนที่สร้างโปรตีนตัวรับแอลดีแอลหรือไม่ และมีความสัมพันธ์อย่างไร นอกจากนี้คือการศึกษายีน PCSK9 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการนำตัวรับกลับไปใช้ใหม่ และยีน LDLRAP1 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำแอลดีแอลเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการเอ็นโดไซโทซิส

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จิรเดช มโนสร้อย. อร์ญญา มโนสร้อย และ ยงยุทธ โรจนสกุล. 2547. **การรักษาในระดับยีน.**

สำนักพิมพ์โอเคียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

นายศรี สุพรศิลป์ชัย. 2546. Risk Factors Intervention Policy Risk Factors Intervention Policy To

Prevent Cardiovascular disease To Prevent Cardiovascular disease: MoPH MoPH, ใน

การประชุมระดับวิทยา ภายใต้โครงการระดับวิทยา. สมาคมแพทย์โรคหัวใจแห่ง

ประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.

ชั้นยชัย สุระ. 2546. การให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์ทั่วไป และสำหรับโรคธาลัสซีเมีย, น. 85-92.

ใน บุญเชิธร ปานเสถียรกุล, บรรณาธิการ. **ธาลัสซีเมีย และการให้คำปรึกษาแนะนำ.**

โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, กรุงเทพฯ

นเรศร สุขเจริญ. อภิวัฒน์ มุทิตางกูร และ ยง ภู่วรรณ, 2542. **อณูชีววิทยาทางการแพทย์**

Molecular Biology in Medicine. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด,

กรุงเทพฯ

นิโคลบ เนืองตัน. 2542. **ชีวเคมี 2.** บริษัท ธรรมสาร จำกัด, กรุงเทพฯ.

ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์. 2549. **พันธุกรรมมนุษย์เกี่ยวข้องกับจริยธรรมอย่างไร.**

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ โล่ห์เลขา. 2536. **ไลโปโปรตีน และภาวะหลอดเลือดแข็ง.** สำนักพิมพ์ชัยเจริญ, กรุงเทพฯ.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. **ชีววิทยาของเซลล์ (Cell biology).** สำนักพิมพ์โอเคียนสโตร์,

กรุงเทพฯ.

วิชัย เอื้อสียาพันธุ์. 2545. **ชีวเคมีทางการแพทย์.** บริษัทบุ๊คเน็ต จำกัด, กรุงเทพฯ.

วีรพันธุ์ โขวิฑูรกิจ. 2549. **Dydlipidemia**. การประชุมวิชาการโรคต่อมไร้ท่อในเวชปฏิบัติครั้งที่ 21, กรุงเทพฯ.

สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์. 2547. **คลอเลสเทอรอล**. สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุนทราภรณ์ พัทธกุศลกุล. 2549. **ภาวะไขมันในเลือดสูง**. หน่วยตรวจโรคผู้ป่วยนอก
เวชศาสตร์ครอบครัว งานการพยาบาลเวชศาสตร์ทั่วไปและเวชศาสตร์ฉุกเฉิน
ภาควิชาพยาบาลศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ สุคนธธรรมพ์ และ ศรีนัย ควรประเสริฐ. 2546. **New guidelines in coronary artery disease**. ไอแอมออเกโนเซอร์แอนด์แอ็คเวอร์ไทซิง, เชียงใหม่.

Centre for Genetics Education. 2004. **Familial Hypercholesterolaemia**. Genetic Conditions –
Changes to a Single Gene, Fact Sheet, Centre for Genetics Education, Australia.
Available Source: <http://www.genetics.com.au/factsheet/default.htm>, February, 2004.

Clinical Pharmacology Review. 2007. **Drugs Used to Treat Hyperlipidemia**. Hyperlipidemia.
Available Source: <http://www.ovc.uoguelph.ca/BioMed/Courses/Public/Pharmacology/pharmsite/98-409/Blood/hyperlipidemia.html>, March 31, 2007.

Cohn R.M., K.S. Roth. 1996. **Biochemist and disease: bridging basic science and clinical practice**. Williams and Wilkins, USA

Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences,
National Research Council. 1989. **Diet and Health: implications for reducing chronic disease risk**. National Academy Press, Washington, DC.

- Cooper, G.M. and R.E. Hausman. 2004. **The Cell: A Molecular Approach**. 3rd ed. The American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gelehrter T.D. and F.S. Collins. 1990. **Principles of medical genetics**. McGraw Hill, New York.
- Gibert H.F. 1992. **Basis concepts in biochemistry**. McGraw Hill, Singapore.
- Goldstein, J.L., H.H. Hobbs and M.S. Brown. 2001. **Familial Hypercholesterolemia. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th ed. McGraw Hill, New York.
- Lindberg D. 2007. **Medical Encyclopedia**. Medline Plus. U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health, Department of Health & Human Services, Freedom of Information Act , USA. Available Source: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html>, February 23, 2007.
- Nissen, H., P. Guldberg, A.B. Hansen, N.E. Petersen and M. Horder. 1996. Clinically applicable mutation screening in familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**. 8 (2):168-177.
- Pitaknantakul, K. 1998. **An In Vitro Model for The Study of Fe-Catalyzed Oxidation of LDL**. M.S. thesis, Mahidol University.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Soutar, A.K., R.P. Naoumova. 2007. Mechanism of disease: genetic cause of familial hypercholesterolemia. **Nature clinical practice cardiovascular medicine** , 4 (4): 214-225

Steinberg D. 1989. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl Med**, 320: 915-924.

Thompson, M.W., R.R. McLennes and H.F. Willard. 1991. **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**. 5th ed. WB Saunders, Philadelphia.

US Food and Drug Administration. 2007. **Food pyramid**. US Food and Drug Administration, Us. Available Source: <http://www.fda.gov>, March, 2007.

Voet D., J. Voet and D.J.G. Voet. 1995. **Lipid metabolism**. 2nd ed. John Wiley, New York.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- | | | |
|---|----|----|
| 1. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 6-7 | 50 | ml |
| 1. SDS | 5 | g |
| 2. Distilled water | 50 | ml |

* Keep in room temperature

- | | | |
|-------------------------|-----|----|
| 2. 5 mg/ml Proteinase K | 20 | ml |
| 1. Proteinase K | 100 | mg |
| 2. Distilled water | 20 | ml |

* Aliquot in 1.5 ml tube @ 1 ml

* Keep in freezer below -20 °C

- | | | |
|---|-------|----|
| 3. 0.5M Tris-HCl, pH 8.0 | 400 | ml |
| 1. Trizma base | 24.22 | g |
| 2. Distilled water | 320 | ml |
| 3. Adjust pH to 8.0 by conc. HCl (~10 ml) | | |
| 4. Final volume | 400 | ml |

* Keep at room temperature

(Note : use 250 ml at step 3, then dilute the rest by 1:4 of water to 0.1

M Tris-HCl, pH 8 just enough for step 4 and 5)

- | | | |
|-----------------------------|------|----|
| 4. Saturated phenol, pH 8.0 | 250 | ml |
| 1. Phenol (melt at 65 °C) | 250 | g |
| 2. 8-Hydroxyquinoline | 0.25 | g |

* Add while phenol still at 65°C.

- | | | |
|---------------------------|-------------|----|
| 3. 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0 | approx. 250 | ml |
|---------------------------|-------------|----|

* Pour buffer in phenol bottle, shake then transfer into 1 lt. bottle, shake for 15 minutes continuously.

* Let solution separate into 2 layers, the top should be transparent within a few minutes. Otherwise shake again. Discard the top layer by suction gently, leave the least possible.

4. 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 approx. 250 ml

* Mix with phenol, shake for 15 minutes then follow the rest of step 3.

5. 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 approx. 250 ml

* As step 4.

* Check pH by universal pH paper, pH should be 8.0

* Keep at 4-10°C

5. Chloroform-isoamyl alcohol 24:1 v/v 1000 ml

1. Chloroform 960 ml

2. Isoamyl alcohol 40 ml

* Keep at 4-10°C

6. 3M Na-acetate, pH 5.6 100 ml

1. Na-acetate 24.61 g

2. Distilled water 80 ml

3. Adjust pH to 5.6 by glacial acetic acid

4. Final volume 100 ml

* Sterile by autoclave and keep at room temperature

7. 70% Ethanol 250 ml

1. Absolute ethanol 175 ml

2. Distilled water 75 ml

* Keep at room temperature

8. 0.2M Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 50 ml

1. EDTA 3.72 g

2. Distilled water 50 ml

* Sterile by autoclave and keep at room temperature

9. Lysis buffer	1000	ml
1. Trima base	12.1	g
2. Sucrose	109.5	g
3. Distilled water	800	ml
4. Adjust pH to 7.5 by cone. HCl		
5. Triton x 100	10	ml
6. Distilled water to final volume	1000	ml

* Sterile by autoclave and keep at 4-10°C

10. 10X Sodium chloride-Tris-EDTA buffer (STE Buffer)	100	ml
1. Trisma base	6.05	g
2. EDTA	0.37	g
3. NaCl	5.84	g
4. Distilled water	80	ml
5. Adjust pH to 7.5 by cone. HCl		
6. Distilled water to final volume	100	ml

* Sterile by autoclave and keep at room temperate

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล

1. 10X Tris boric EDTA buffer (TBE buffer)	1000	ml
1. Trizma base	108	g
2. Boric acid	55	g
3. EDTA	9.5	g
4. Distilled water to final volume	1000	ml

* Keep at room temperature

2. Ficoll-bromphenol Blue	25	ml
1. Ficoll	4	g
2. Bromphenol blue	0.06	g
3. 1X TBE	25	ml

* Aliquot into 1.5 ml tube and keep at below -20 °C.

3. 10 mg/ml Ethidium bromide	5	ml
1. Ethidium bromide	50	mg
2. Distilled water	5	ml

* Keep at room temperature in dark

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสด้วยวิธี SSCP

1. 40% acrylamide (19:1)	100	ml
1. acrylamide	38	g
2. bisacrylamide	2	g
3. Distilled water to final volume	100	ml

* Keep at 4-10⁰C

2. 10X Tris boric EDTA buffer (TBE buffer)	1000	ml
1. Trizma base	108	g
2. Boric acid	55	g
3. EDTA	9.5	g
4. Distilled water to final volume	1000	ml

* Keep at room temperature

3. 20% Ammoniumpersulfate	1	ml
1. NH ₄ (SO) ₂	0.2	g
2. Distilled water to final volume	1	ml

* Keep at 4-10⁰C

4. 0.5X Tris boric EDTA buffer (TBE buffer)	1000	ml
1. 10X TBE	50	ml
2. Distilled water to final volume	1000	ml

* Keep at room temperature

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมโพไลอะครีลาไมด์เจลอิลีกโทรโฟริซิสด้วยวิธีซิลเวอร์สเตน

1. Solution I (10% Ethanol, 0.5% acetic acid)	1000	ml
1. Absolute Ethanol	100	ml
2. Glacial acetic acid	5	ml
3. Distilled water to final volume	1000	ml
* Keep at room temperature		
2. Solution II (0.1% silver nitrate)	1000	ml
1. AgNO ₃	1	g
2. Distilled water to final volume	1000	ml
* Keep at room temperature		
3. Solution III (1.5% NaOH, 0.1% formaldehyde)	200	ml
1. NaOH	3	g
2. 37% formaldehyde	0.54	ml
3. Distilled water to final volume	200	ml
* This solution must be prepared immediately before use.		
4. Solution IV (0.75% sodium carbonate)	1000	ml
1. Na ₂ CO ₃	7.5	g
2. Distilled water to final volume	1000	ml
* Keep at 4-10 ⁰ C		

ประวัติการศึกษา

ชื่อ นายรัชต์ล สว่างพาณิชย์

เกิดวันที่ 12 พฤศจิกายน พ.ศ. 2524

สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา วท.บ. (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2545)